

Aus der Pharma-Forschung der Schering AG Berlin/Bergkamen,
Fachbereich II (Prof. Dr. Dr. E. Gerhards) und dem Institut für Tier-
physiologie und Angewandte Zoologie der Freien Universität Berlin
(Prof. Dr. K. Graszynski)

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUM
TESTOSTERONSTOFFWECHSEL IN VITRO
AM LEBERGEWEBE VERSCHIEDENER SPEZIES**

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs 23 (Biologie)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Winfried Richter
aus Braunau

1976

Aus der Pharma-Forschung der Schering AG Berlin/Bergkamen,
Fachbereich II (Prof. Dr. Dr. E. Gerhards) und dem Institut für Tier-
physiologie und Angewandte Zoologie der Freien Universität Berlin
(Prof. Dr. K. Graszyński)

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUM TESTOSTERONSTOFFWECHSEL IN VITRO AM LEBERGEWEBE VERSCHIEDENER SPEZIES



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs 23 (Biologie)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Winfried Richter
aus Braunau

1. Referent: Prof. Dr. Dr. E. Gerhards

2. Referent: Prof. Dr. K. Graszynski



Tag der mündlichen Prüfung:

12. 3. 1976

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Zusammenfassung</u>	1
2.	<u>Einleitung</u>	4
3.	<u>Material, Geräte und Methoden</u>	14
3.1.	<u>Material</u>	14
3.1.1.	Reagentien	14
3.1.2.	Tiere	15
3.2.	<u>Geräte</u>	16
3.3.	<u>Methoden</u>	17
3.3.1.	Inkubationen	17
3.3.1.1.	Inkubationen mit 10 000Xg-Überstand bzw. 100 000Xg-Überstand und -Sediment im NADPH regenerierenden System (52,53)	18
3.3.1.2.	Inkubationen zur Lokalisation einer NAD^{+} - und einer NADP^{+} -spezifischen 17β -Hydroxy- steroiddehydrogenase in der Leber (34) mit 24 500Xg-Überstand und -Sediment und Homogenat	19
3.3.2.	Chromatographische Auftrennung der Ex- trakte zur Bestimmung des Testosteron- abbaus	20
3.3.3.	Rechnerische Bestimmung des Testoste- ronabbaus	21
3.3.4.	Chromatographische Charakterisierung des Testosterons und seiner Metabolite	21
3.3.5.	Bestimmung des Progesteronabbaus	23
3.3.6.	Chromatographiesysteme	24
3.3.7.	Radioaktivitätsmessung	25
3.3.8.	Proteinbestimmung	26
3.3.9.	Färbung von Steroiden auf Papier- und Dünnschichtchromatogrammen	26

3.3.10.	Mikroreaktionen	27
3.3.11.	Versuch zur Ausscheidung von 4- ¹⁴ C- Testosteron bei Meerschweinchen über Harn und Stuhl	27
4.	<u>Ergebnisse</u>	31
4.1.	<u>Testosteronabbau im 10_000Xg-Überstand der Leber männlicher Ratten, Mäuse, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen</u>	31
4.1.1.	Untersuchungen mit Lebergewebe der Ratte	31
4.1.2.	Untersuchungen mit Lebergewebe der Maus	34
4.1.3.	Untersuchungen mit Lebergewebe des Streifenhamsters	38
4.1.4.	Untersuchungen mit Lebergewebe des Meerschweinchens	41
4.1.5.	Untersuchungen mit Lebergewebe männlicher Kaninchen	42
4.1.6.	Untersuchungen mit Lebergewebe weiblicher Kaninchen	47
4.1.7.	Untersuchungen zum Progesteronstoff- wechsel mit Lebergewebe männlicher Kaninchen	53
4.1.8.	Untersuchungen zum Progesteronstoff- wechsel mit Lebergewebe weiblicher Kaninchen	58
4.1.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Testosteron- und Progesteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber von Ratte, Maus, Hamster und Kaninchen	63

4.2.	<u>Testosteronstoffwechsel im Vollhomo-</u> <u>genat, dem 24 500Xg-Sediment und</u> <u>-Überstand aus dem Lebergewebe der</u> <u>Ratte und Maus sowie des Hamsters,</u> <u>Meerschweinchens und Kaninchens mit</u> <u>NAD⁺ bzw. NADP⁺ als Wasserstoffakzep-</u> <u>toren</u>	67
4.2.1.	Untersuchungen mit Lebergewebe der Ratte	67
4.2.2.	Untersuchungen mit Lebergewebe der Maus	73
4.2.3.	Untersuchungen mit Lebergewebe des Streifenhamsters	79
4.2.4.	Untersuchungen mit Lebergewebe des Meerschweinchens	85
4.2.5.	Untersuchungen mit Lebergewebe des Kaninchens	91
4.2.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Testosteronschwund im Vollhomogenat, dem 24 500Xg-Überstand und -Sediment der Leber von Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen	97
4.3.	<u>Testosteronstoffwechsel in vivo nach</u> <u>intraperitonealer Injektion beim</u> <u>Meerschweinchen</u>	98
4.3.1.	Bilanz der Wiederfindung der injizier- ten ¹⁴ C-Aktivität	98
4.3.2.	Differenzierung der ¹⁴ C-Aktivität im Harn	99
4.3.3.	Differenzierung der Konjugate	100
4.3.4.	Charakterisierung des Metaboliten- spektrums	101

5.	<u>Diskussion</u>	106
6.	<u>Literatur</u>	119
7.	<u>Lebenslauf</u>	125

1. Zusammenfassung

1.1. Der Stoffwechsel von 4-¹⁴C-Testosteron wurde durch Inkubationen im NADPH-regenerierenden System mit dem 10 000Xg-Überstand der Leber von Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen vergleichend untersucht; um Hinweise auf eine mögliche Substratspezifität der am Steroidstoffwechsel beteiligten reduzierenden und oxydierenden Enzymsysteme der Kaninchenleber zu erhalten, wurden unter den o.g. Bedingungen Inkubationen mit 4-¹⁴C-Progesteron durchgeführt.

Durch Inkubationen im NADPH-regenerierenden System wurde unter Verwendung von verschiedenen Zellfraktionen der Kaninchenleber versucht, die Testosteron und Progesteron metabolisierenden Enzymsysteme in der Leberzelle zu lokalisieren.

Die Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des Testosteronumsatzes auf 5 Minuten ergab für die untersuchten Tiere folgende Werte: Ratte (16%), Kaninchen (23%), Hamster (34%) und Maus (48%); die Meerschweinchenleber zeigte unter den angewendeten Versuchsbedingungen keinen Testosteronabbau.

Das Metabolitenspektrum setzte sich bei Ratte, Maus und Hamster stets aus den gleichen Komponenten zusammen (5 α - bzw. 5 β -Androstandiol und 4-Androsten-3,17-dion), die je nach Spezies in unterschiedlichem Verhältnis zueinander auftraten; beim Kaninchen waren nur die im Ring A reduzierten Metabolite nachweisbar.

Die Umsatzgeschwindigkeit für Progesteron in der Leber männlicher und weiblicher Kaninchen war wesentlich höher (95% bzw. 66% in 5 Min.) als die des Testosterons. Das Metabolitenspektrum des Progesterons bestand nach Inkubation mit dem 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher und weiblicher Kaninchen im NADPH-regenerierenden System im wesentlichen aus im Ring A reduzierten Verbindungen.

Sowohl die Mikrosomenfraktion als auch das Cytosol

der Kaninchenleber sind in der Lage, Testosteron und Progesteron zu metabolisieren; jedoch ist die Enzymaktivität in den Mikrosomen im Vergleich zum Cytosol etwa doppelt so hoch (4.1., S.31).

1.2. Es wurden Inkubationen mit dem Homogenat, dem 24 500Xg-Überstand und dem 24 500Xg-Sediment aus der Leber von Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen in Gegenwart von NAD^+ und NADP^+ als Wasserstoffakzeptoren und Testosteron als Substrat durchgeführt. Bei allen untersuchten Tieren war als Metabolit lediglich 4-Androsten-3,17-dion nachweisbar.

Bei der Maus, dem Hamster, dem Meerschweinchen und dem Kaninchen ist die 17-Oxydation sowohl NAD^+ - als auch NADP^+ -abhängig; bei der Ratte läuft die 17-Oxydation dagegen nur in Gegenwart von NAD^+ mit vergleichbarer Geschwindigkeit ab und in Gegenwart von NADP^+ relativ langsamer.

Bei der Ratte und dem Meerschweinchen ist die oxydierende Enzymaktivität vorwiegend in den Mikrosomen und bei der Maus, dem Hamster und dem Kaninchen bevorzugt im Cytosol lokalisiert.

Die 17-Oxydation verläuft bei der Ratte und dem Hamster im Gegensatz zur Maus, dem Meerschweinchen und dem Kaninchen relativ langsam.

Bei Vergleich der untersuchten Tiere im Hinblick auf den Testosteronstoffwechsel (Ring-A-Reduktion und 17-Oxydation) lassen sich folgende Stoffwechsel-typen feststellen:

Ratte: sowohl oxydativ als auch reduktiv

Maus: sowohl oxydativ als auch reduktiv

Hamster: reduktiv

Meerschweinchen: oxydativ

Kaninchen: reduktiv (4.2., S.67)

1.3. Männlichen und weiblichen Meerschweinchen wurden jeweils 0.1 mg 4- ^{14}C -Testosteron intraperitoneal

verabreicht; es wurde die Ausscheidung über Harn und Stuhl untersucht. Nach 197 Stunden hatten die Tiere von der verabreichten Menge ca. 45-55% über den Harn und ca. 7% über den Stuhl ausgeschieden; die restliche Aktivität war überwiegend im Peritoneum nachweisbar.

Von der über den Harn ausgeschiedenen Aktivität entfielen 16-18% auf unkonjugierte Verbindungen, 40% auf Glucuronide, 6% auf enzymatisch spaltbare Steroidsulfate und 15% auf solvlysierbare Konjugate; ca. 11% der über den Harn ausgeschiedenen Aktivität bestanden aus nicht spaltbaren Steroidkonjugaten.

Der weitaus größte Teil der aus dem Harn isolierten Metabolite verhielt sich chromatographisch wie 6 β -OH-Testosteron und 7 α -OH-4-Androsten-3,17-dion (4.3., S.98).

2. Einleitung

Die Anforderungen an toxikologische und pharmakologische Prüfungen von Pharmaka an verschiedenen Spezies haben unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Für derartige Untersuchungen werden je nach Fragestellung Ratten, Mäuse, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde und einige Primatenarten benutzt. Es wird angestrebt, ein "Idealtier" zu finden, das für toxikologische Langzeitversuche geeignet ist, deren Ergebnisse sich auf den Menschen übertragen lassen. Dieses "Idealtier" müßte sich im Hinblick auf Biodynamik und Biotransformation des zu untersuchenden Pharmakons wie der Mensch verhalten; das heißt, dieses Pharmakon müßte von diesem Tier genau wie beim Menschen resorbiert, metabolisiert und eliminiert werden. Weiterhin müßte an dieses "Idealtier" die Forderung gestellt werden, daß es bei Behandlung mit einem Pharmakon die gleichen erwünschten und unerwünschten Wirkungen zeigt wie der Mensch. Vergleicht man diese Forderungen an "ideale Spezies" mit den praktischen Möglichkeiten der Durchführung von toxikologischen und pharmakologischen Prüfungen, erkennt man, wie weit man von der rationalwissenschaftlichen Durchführung solcher Prüfungen entfernt ist. Bis vor wenigen Jahren wurden solche Prüfungen vorwiegend an Ratten und Hunden durchgeführt, ohne die oben genannten Fragen zu stellen. Im allgemeinen ging man so vor, daß man die klinisch vorgesehene Dosis, bezogen auf Kilogramm Körpergewicht, und ein Vielfaches davon täglich applizierte, ohne zu berücksichtigen, daß es dabei zu extremen Kumulationen des Pharmakons oder seiner Metabolite im Körper kommen konnte, wenn die betreffende Spezies nicht in der Lage war, das Pharmakon mit der erforderlichen Geschwindigkeit zu metabolisieren und/oder auszuscheiden. Der erste Schritt zu einer rationalen toxikolo-

gischen Prüfung wäre eine Prüfung der Pharmakokinetik beim Menschen. Aufgrund der dabei gewonnenen Daten wäre dann eine Spezies zu suchen, die sich bezüglich der Pharmakokinetik wie der Mensch verhält.

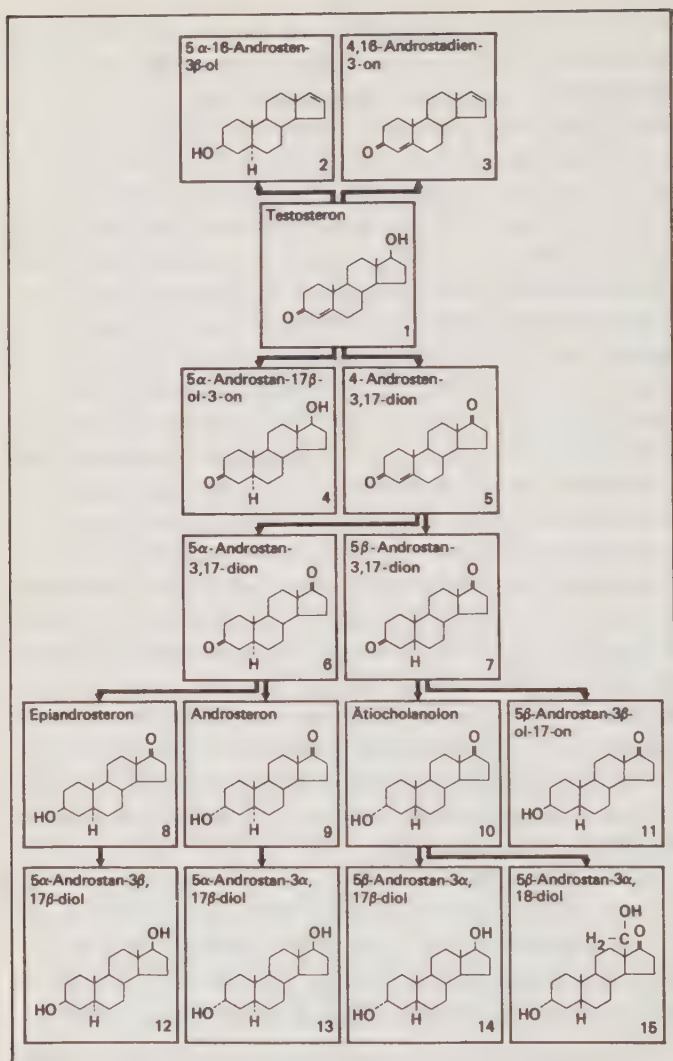
Die zweite Forderung, die erwünschten und unerwünschten Wirkungen betreffend, ist in der Praxis nicht zu stellen, da sich erst bei der langdauernden klinischen Anwendung manche Nebenwirkungen zeigen. Bei Steroiden zum Beispiel ist die Frage wichtig, ob sie beim Tier das gleiche Spektrum an Wirkungen und Nebenwirkungen zeigen wie beim Menschen. Die Mißachtung dieser Forderung hat zu schweren Fehldeutungen von toxikologischen Ergebnissen geführt.

Wichtig für die Auswahl der geeigneten Spezies für toxikologische Untersuchungen ist die qualitative und quantitative Übereinstimmung des Metabolitenspektrums mit dem des Menschen. Trotz der zahlreichen Untersuchungen mit den verschiedensten Pharmaka ist es zur Zeit nur in bescheidenem Umfang möglich, Voraussagen zu machen, wie eine bestimmte Spezies mit einem neuen Pharmakon verfährt. Zielvorstellung pharmakologischer Untersuchungen ist es, Daten zu sammeln, durch deren sinnvolle Kombination derartige Voraussagen möglich werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, hierzu einen Beitrag zu leisten und am Beispiel eines Pharmakons das Verhalten wesentlicher Biotransformationsschritte bei verschiedenen in der Pharmakologie und Toxikologie benutzten Spezies zu untersuchen.

Das Testosteron wurde gewählt, weil seine Biotransformation und seine Pharmakokinetik beim Menschen recht gut bekannt sind. Außerdem eignet sich das Testosteron für derartige Untersuchungen recht gut, da seine Biotransformation im wesentlichen auf drei Reaktionstypen beschränkt ist:

- a) Reduktion der Δ^4 -Doppelbindung
- b) Reduktion der 3-Ketogruppe
- c) Oxydation der β -ständigen 17-OH-Gruppe im Ring D

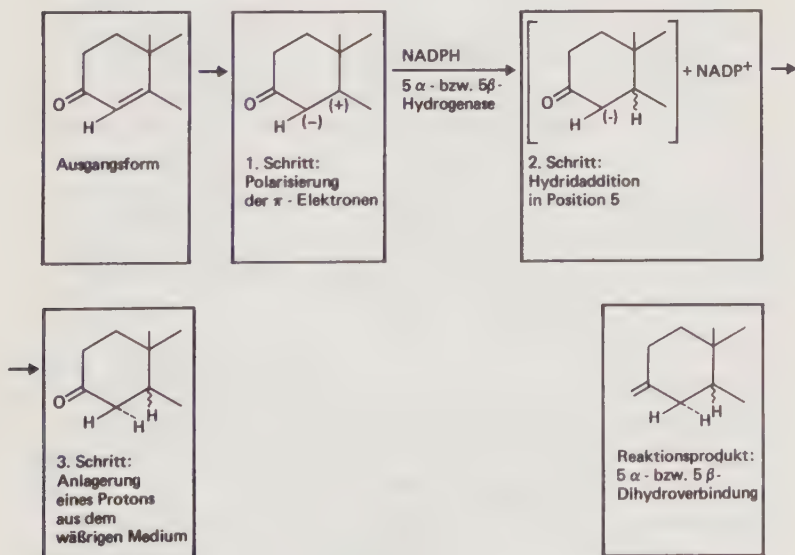


Metabolite des Testosterons, Ergebnisse aus in vivo- und in vitro-Experimenten (entnommen aus (1), verändert)

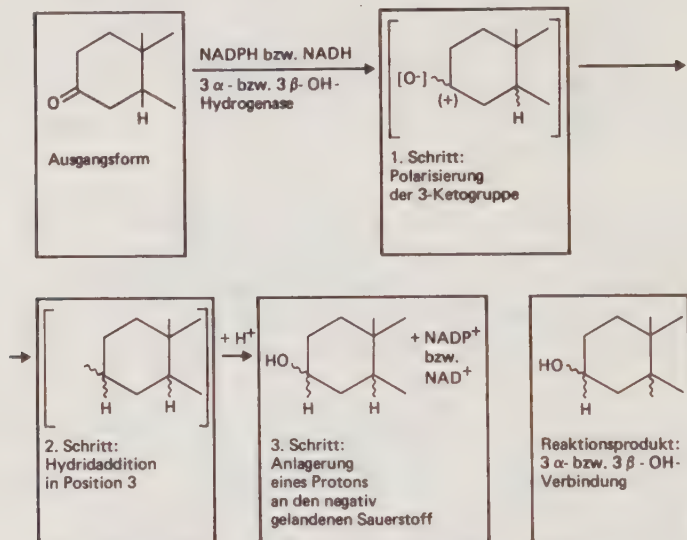
Es ist bekannt, daß die wesentlichen Schritte zum Metabolismus des Testosterons in der Hydrierung der Δ^4 -Doppelbindung und der anschließenden Reduktion der 3-Keto-Gruppe zur 3 α -OH- oder 3 β -OH-Gruppe bestehen (2,3). Außer dieser Ring-A-Reduktion ist von vielen Spezies die Fähigkeit bekannt, die β -ständige OH-Gruppe am Ring D zur 17-Ketogruppe zu oxydieren. Die Darstellung auf Seite 6 gibt eine Übersicht über diese und weiterführende bis heute bekannte Stoffwechselwege des Testosterons (entnommen aus (1), verändert).

Die drei Grundreaktionen am Testosteronmolekül laufen in folgender Weise ab:

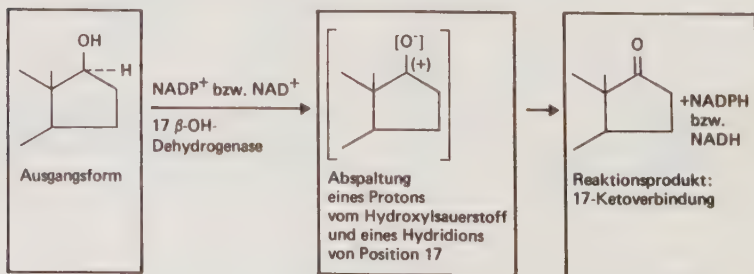
- a) Zunächst wird die Δ^4 -Doppelbindung durch das Enzym 5 α - bzw. 5 β -Hydrogenase (EC 1.3.99.5 bzw. EC 1.3.99.6) hydriert, wobei NADPH als Coenzym fungiert:



- b) Die Reduktion der 3-Ketogruppe zur 3 α - bzw. 3 β -OH-Gruppe wird durch das Enzym 3 α - oder 3 β -OH-Hydrogenase (EC 1.1.1.51) mit NADH bzw. NADPH als Wasserstoffdonator katalysiert:



- c) Die Oxydation der 17 β -OH-Gruppe zur 17-Ketogruppe wird durch das Enzym 17 β -OH-Dehydrogenase (EC 1.1.1.63 bzw. EC 1.1.1.64) katalysiert, wobei NAD⁺ bzw. NADP⁺ als Wasserstoffakzeptor dient:



Die Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe im Ring A erfolgt in zwei Stufen, wie vorstehend gezeigt (2). Zuerst wird die Δ^4 -Doppelbindung hydriert (3), und erst darauf erfolgt die Reduktion der 3-Ketogruppe.

Die Hydrierung der Δ^4 -Doppelbindung in der Rattenleber nach 5α -H oder 5β -H läuft in verschiedenen Zellfraktionen ab. Forchielli und Mitarb. wiesen in Übereinstimmung mit anderen Autoren im partikelfreien Überstand der Rattenleber eine 5β -Hydrogenase, in der Mikrosomenfraktion eine 5α -Hydrogenase nach (4,5,6,7,8). Beide Enzyme brauchen NADPH als Cofaktor und sind bei beiden Geschlechtern nicht identisch. So berichten mehrere Autoren, daß die 5α -Hydrogenase aus der Leber weiblicher Ratten etwa dreimal aktiver ist als die 5α -Hydrogenase aus der Leber männlicher Ratten (6,7,8,9); die 5β -Hydrogenase männlicher Tiere dagegen ist weit aktiver als das entsprechende Enzym der weiblichen Rattenleber (9).

Die Tatsache, daß bei Perfusionsversuchen oder Inkubationen mit Leberschnitten oder Leberhomogenat nur 5α -reduzierte Testosteronmetabolite erscheinen, erklären Forchielli und Mitarbeiter (4) durch die wesentlich höhere Aktivität der mikrosomalen 5α -Hydrogenase gegenüber der cytoplasmatischen 5β -Hydrogenase; da bei beiden Geschlechtern die cytoplasmatische 5β -Hydrogenase eine sehr viel geringere Aktivität als die mikrosomale 5α -Hydrogenase aufweist, kommt nur der für die 5α -Hydrogenase charakteristische Geschlechtsunterschied zur Wirkung (10).

Die Aussagen früherer Autoren bezüglich der Lokalisation der 5α - bzw. 5β -Hydrogenase konnten Ota und Mitarb. (11) mit ihren Untersuchungen zum Testosteronmetabolismus in der männlichen und weiblichen Rattenleber bestätigen. In Übereinstimmung mit Gustafsson und Mitarb. (12) zeigten sie, daß die Leber männlicher Ratten vermehrt hydroxylierte Testosteronmetabolite bildet.

Kastration oder die Behandlung männlicher Ratten mit Östrogenen ergab Ähnlichkeiten mit dem Metaboliten-spektrum der Leber weiblicher Tiere. Eine mögliche Erklärung ist die Beeinflussung der 5α -Hydrogenase durch Östrogenbehandlung, wie sie Bonne und Mitarb. (13) bei Untersuchungen an Prostatamikrosomen nachweisen konnten. Im Gegensatz zur Leber tritt in der Rattenprostata nicht nur eine mikrosomale 5α -Hydrogenase, sondern auch eine in den Kernen lokalisierte 5α -Hydrogenase auf (14). Jedoch unterscheiden sich die 5α -Hydrogenasen aus der Prostata und der Leber erheblich in ihrer Aktivität (15).

Die Hydrierung der 3-Ketogruppe nach 3α -OH oder 3β -OH wurde von Björkhem und Mitarb. (16) beschrieben. Diese Reaktion läuft in Gegenwart von NADH oder NADPH bei der Inkubation von 3-Ketosteroiden mit Rattenlebermikrosomen ab, wobei in Gegenwart von NADH eine höhere Umsatzrate zu verzeichnen war.

Die Möglichkeit der Einflußnahme auf die Ring-A-Reduktion von Δ^4 -3-Ketosteroiden wurde von verschiedenen Autoren untersucht. So beschrieben McGuire und Mitarb. (17) die Bildung von vorwiegend 3α -OH-Verbindungen aus Δ^4 -3-Ketosteroiden durch Lebermikrosomen thyroxinbehandelter Tiere. Die Lebermikrosomen unbehandelter Tiere setzen unter gleichen Bedingungen Δ^4 -3-Ketosteroide vorwiegend zu 3β -Hydroxyverbindungen um.

Der Einfluß verschiedener Substituenten am Steroidmolekül auf die mikrosomale 5α -Hydrogenase der Rattenleber wurde ebenfalls von McGuire und Mitarb. (18) beschrieben. Bei der Untersuchung der Ring-A-Reduktion von Δ^4 -3-Ketosteroiden mit Halogen- bzw. Methylsubstituenten durch die cytoplasmatische 5β -Hydrogenase aus der männlichen Rattenleber entdeckten Ringold und Mitarb. (19) einen ungewöhnlichen Reaktionsverlauf. Bei Halogensubstituenten an C_2 , C_4 und C_6 wird die Stufe der Hydrierung der Δ^4 -Doppelbindung praktisch übergangen und es erscheinen Δ^4 - 3α - bzw. Δ^4 - 3β -Hydroxyverbindungen.

Von einer Hemmung sowohl der 17-Oxydation als auch der

Reduktion der 3-Ketogruppe beim Metenolon (1-Methyl-5 α -Androst-1-en-17 β -ol-3-on)⁺⁾ berichten mehrere Autoren (20, 21,22,23). Gerhards und Mitarb. (24,25) beschrieben den Einfluß von Methylsubstituenten auf enzymatische Reaktionen am Steroidmolekül. Durch Substitution an verschiedensten Stellen des Steroidmoleküls gelang es, sowohl die mikrosomale 5 α -Hydrogenase als auch die cytoplasmatische 5 β -Hydrogenase zu beeinflussen.

Bei Inkubationen von Testosteron mit Leberbrei konnten Levedahl und Mitarb. (26) bei Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen eine 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase nachweisen.

Im Gegensatz zur Ratte, die vorwiegend im A-Ring vollständig reduzierte Testosteronmetabolite produziert, neigt das Meerschweinchen stärker dazu, die 17 β -Hydroxygruppe zu oxydieren (27,28). Obwohl bereits Autoren die vollständige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe durch Lebergewebe des Meerschweinchens in vitro beschrieben hatten (29,30,31,32), berichten Brown-Grant und Mitarb. (33) vom Fehlen einer Δ^4 -3-Ketoreduktase in der Leber und den anderen Geweben des Meerschweinchenkörpers; lediglich in den Nebennieren konnte eine Δ^4 -3-Ketoreduktaseaktivität nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist die ausgeprägte Fähigkeit der Meerschweinchenleber, Hydroxylierungsprodukte des Testosterons und Androstendions zu bilden (30, 31). Endahl und Mitarb. (34) berichten von einer NADP⁺-spezifischen 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase im Cytoplasma und einer NAD⁺-spezifischen 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase im 24 500Xg-Sediment der Leber männlicher Meerschweinchen. Ähnliche Ergebnisse erhielten schon früher Hagermann und Mitarb. (35) bei der Untersuchung der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase. An diese Befunde knüpfen Breuer und Mitarb. (36) mit ihren Untersuchungen einer cytoplasmatischen 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase in der Kaninchenleber an; es wird von einer 17 α - bzw. 17 β -Hydroxygruppen oxydierenden Dehydrogenase berichtet, die zwar nicht in zwei aktive

⁺⁾ Primobolan, Schering AG

Komponenten zu zerlegen ist, aber sowohl mit NAD^+ als auch NADP^+ als Wasserstoffakzeptor reagiert. Eine 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase aus der menschlichen Plazenta mit gleichem Verhalten konnten Jarabak und Mitarb. (37) 2500fach anreichern.

Nachdem Kochakian und Mitarb. (38) über die 17-Oxydation von Testosteron im Homogenat aus Kaninchenleber berichtet hatten und es Breuer und Mitarb. (36) gelungen war, eine 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase im Cytoplasma der Kaninchenleber zu lokalisieren, konnten Bongiovanni und Mitarb. (39) auch eine mikrosomale 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase nachweisen. Die vollständige Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe des Androstendions zum Androsteron durch Leberhomogenat von Kaninchen beschrieben Kochakian und Mitarb. (29). Diese Reaktion ist nach Bhavani und Mitarb. (40) durch Substituenten beeinflussbar. Taylor (41) fand nach Inkubation von Progesteron mit Kaninchenleberhomogenat 5α - bzw. 5β -reduzierte 3α - bzw. 3β -Hydroxymetabolite des Progesterons wieder. Diese Ergebnisse werden durch Chatterton und Mitarb. (42) bestätigt. Nach intravenöser Verabreichung von Progesteron konnten sie in der Kaninchenleber 5β - 3α - bzw. 5α - 3β -Hydroxyprodukte nachweisen. Demisch und Mitarb. (43) berichten über die Identifizierung von hydroxyliertem Testosteron und Androstendion nach der Perfusion von weiblichen fötalen Kaninchenlebern mit Testosteron.

Bei Inkubationsversuchen mit Leberhomogenat von sechs verschiedenen Mäusestämmen konnten Shire und Mitarb. (44) im Ring A vollständig reduzierte Metabolite des Corticosterons identifizieren. Im Gegensatz zur Leber sind die Nieren von Mäusen in der Lage, Androstendion oder Testosteron zu Epitestosteron zu metabolisieren. Wie Arimasa und Mitarb. (45) weiter berichten, konnten sie im partikelfreien Überstand und in der Mikrosomenfraktion der Leber von Mäusen 17-Ketoreduktaseaktivität nachweisen, wobei die mikrosomale 17-Ketoreduktase eine starke NADPH-Spezifität zeigte. Eine 17β -Hydroxy-

steroiddehydrogenase in der Leber männlicher Mäuse konnten Thorsen und Mitarb. (46) beim Umsatz von 17 β -Östradiol mit Leberschnitten nachweisen. Lerner und Mitarb. (47) berichten über den Nachweis einer 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase im Ovar der Maus. Reduzierende Ring-A-Hydrogenasen in verschiedenen Organen der Maus wurden von einigen Autoren beschrieben (48, 49, 50, 51).

Die Reduktion der Δ^4 -Doppelbindung des Testosterons zur 5 α -Verbindung in den einzelnen Zielorganen ist in den letzten Jahren eingehend untersucht worden, da bekannt wurde, daß diese Reaktion das Testosteron in seine Wirkform überführt. So wird zum Beispiel das Testosteron in der Prostatazelle nach Reduktion der Δ^4 -Doppelbindung als 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) an den cytoplasmatischen Rezeptor gebunden und gelangt in dieser Form zum Kern, dem eigentlichen intrazellulären Wirkort des Hormons.

In der hier vorliegenden Arbeit sollten aber die am Ring A und D ablaufenden Reaktionen unter dem Gesichtspunkt der Biotransformation des Testosterons in der Leber zu unwirksamen Metaboliten betrachtet werden; hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Δ^4 -Reduktion in der Leber unter Bildung von DHT die Überführung in eine hochwirksame Substanz bedeutet. Man muß aber davon ausgehen, daß nach dem Eindringen des Testosterons in die Leberzelle die Bildung von DHT und die Folgereaktionen so schnell verlaufen, daß nur äußerst geringe Mengen DHT in den Kreislauf gelangen. Die Plasmakonzentration an nicht konjugiertem DHT beträgt beim erwachsenen Mann nur 10% des nicht konjugierten Testosterons.

Eine weitere Ursache für die geringe DHT-Konzentration im menschlichen Plasma ist die Tatsache, daß im Anschluß an die erfolgte DHT-Bildung in der Leberzelle die 3-Keto-Reduktion, die Oxydation der 17 β -OH-Gruppe und die Konjugatbildung abläuft. In diesem Zusammen-

hang soll darauf hingewiesen werden, daß die 5 α -Metabolite im Gegensatz zu den 5 β -Metaboliten noch eine mehr oder weniger starke Androgenwirkung zeigen. So wurde zunächst als männliches Sexualhormon das Androsteron (s.S.6, Formel 9) aus dem Harn isoliert.

Da bisher keine umfangreichen vergleichenden Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der an der Ring-A-Reduktion und der 17-Oxydation des Testosterons beteiligten Enzyme bei verschiedenen Spezies vorliegen, sollten hier teilweise ohne Berücksichtigung der intrazellulären Verteilung der Enzyme Präparationen von Leberhomogenaten benutzt werden, die sowohl Mikrosomen als auch Cytoplasma enthalten. Für die Untersuchung der Ring-A-Reduktion wurde in allen Fällen der 10 000Xg-Überstand mit NADPH als Wasserstoffdonator eingesetzt.

Für die Untersuchung der 17-Oxydation wurden in Anlehnung an Untersuchungen von Endahl und Mitarb. (34) am Leberhomogenat des Meerschweinchens sowohl 24 500Xg-Überstand als auch -Sediment unter Verwendung von NAD⁺ bzw. NADP⁺ als Wasserstoffakzeptor benutzt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es in erster Linie, am Beispiel des Testosterons festzustellen, ob unter in vitro-Bedingungen grundsätzliche Unterschiede im Hinblick auf die wesentlichen Reaktionen des Steroidstoffwechsels bei verschiedenen Spezies nachweisbar sind.

Daraus ergibt sich, daß zunächst die Frage nach dem Testosteronabbau aufgrund der Ring-A-Reduktion und der 17-Oxydation beantwortet werden sollte. Die entstehenden Metabolite sollten nicht chemisch identifiziert, sondern vielmehr nur durch ihr chromatographisches Verhalten charakterisiert werden, um so mögliche Speziesunterschiede des Testosteronstoffwechsels zu erkennen.

3. Material, Geräte und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Reagentien

4-¹⁴C-Testosteron und

4-¹⁴C-Progesteron, The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England; die radiochemische Reinheit der markierten Steroide wurde in den Systemen PC Syst. I und PC Syst. IV überprüft.

Alle unmarkierten Steroide wurden von der Schering AG/Berlin-Bergkamen zur Verfügung gestellt:

5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol, 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol, 5 β -Androstan-3 β ,17 β -diol, 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol, 4-Androsten-17 β -ol-3-on (Testosteron), 5 α -Androstan-3 α -ol-17-on, 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on, 4-Androsten-3,17-dion, 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on, 5 β -Androstan-3 β -ol-17-on, 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on, 5 β -Androstan-17 β -ol-3-on, 5 α -Androstan-3,17-dion, 5 β -Androstan-3,17-dion, 4-Androsten-3-on-17 β -acetat, 4-Androsten-7 α -ol-3,17-dion, 4-Androsten-6 β ,17 β -diol-3-on, 4-Pregnen-3,20-dion (Progesteron), 4-Pregnen-16 α -ol-3,20-dion, 4-Pregnen-20 β -ol-3-on, 5 α -Pregnan-3,20-dion, 5 β -Pregnan-3,20-dion, 4-Pregnen-20 α -ol-3-on, 5-Pregnen-3 β -ol-20-on, 4-Pregnen-6 β -ol-3,20-dion, 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol, 5 β -Pregnan-3 α ,20 β -diol.

Glucose-6-phosphat (G-6-P), Dinatriumsalz, -Nicotinamiddinucleotid (NAD⁺), Reinheitsgrad I, Nicotinamiddinucleotidphosphat (NADP⁺), Dinatriumsalz und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G-6-PDH), Reinheitsgrad II, Boehringer Mannheim GmbH.

Penicillin G Natrium, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/M.

Sulfatase aus *Helix pomatia*, nach A.B.Roy, 10 000-15 000 E/mg, Ferak Berlin.

β -Glucuronidase, 306 F.E./mg, Schering AG/Berlin-Bergkamen.

Insta-Gel,

2,5-Diphenyloxazol (PPO) und

1,4-Di-(5'-phenyloxazol-2'-yl)-benzol (POPOP),

Packard Instrument Company, Inc., Illinois, USA.

Tris-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan), Merck AG, Darmstadt.

Chromatographiepapier Whatman No.1.

Dünnschichtplatten, Kieselgel HF₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm, 20x20 cm, Merck AG, Darmstadt.

Es wurden stets chemisch reine Lösungsmittel und Reagentien verwendet.

3.1.2. Tiere

Ratten: BR 46-Wistar II, Brünger, Bokel.

Mäuse: NMRI-Haakh-Schering AG/Berlin-Bergkamen.

Hamster: Chinesischer Streifenhamster (*Cricetulus griseus*), Schering AG/Berlin-Bergkamen.

Meerschweinchen: Pir Bright White, Schering AG/Berlin-Bergkamen.

Kaninchen: Hasenkaninchen, Wulf, Königs-luther.

Die Tiere erhielten bis zum Versuch Wasser und Standardfutter ad libitum.

Bei den in vivo-Versuchen erhielten die Meerschweinchen auch während des Versuchs sowohl Wasser als auch Frisch- und Körnerfutter.

In der folgenden Tabelle sind die durchschnittlichen Körper- und Lebergewichte der verwendeten Versuchstiere angegeben:

	Körpergewicht (g)	Lebergewicht (g)
Ratte	183 (180-200)	8,6 (7,6-9,1)
Maus	25 (23-28)	1,3 (1,0-1,5)
Streifenhamster	26 (20-34)	1,6 (1,0-2,8)
Meerschweinchen	430 (385-475)	18,6 (16,8-21,5)
Kaninchen	3400 (2800-3900)	91,0 (68-108)

3.2. _Geräte

Szintillationsspektrometer, Modell 3375,

Packard Instrument Company, Inc., Illinois, USA.

Diskriminatoreinstellung für ^{14}C : 50-1000,

Verstärkung: 8%, Zählausbeute für ^{14}C : 65-70%.

Radioaktivitätsmessungen auf Papierchromatogrammen:

Meßgerät: Strahlungsmeßgerät FH 49 A,

Friesecke & Hoepfner GmbH, Erlangen-Bruck.

Zählrohr: 4π -Doppelgasstromzählrohr LB 6200,

Fa. Berthold, Wildbad.

Schreiber: Potentiometerschreiber Servogor S mit

Integrator, Metrawatt GmbH, Nürnberg.

Radioaktivitätsmessungen auf Dünnschichtchromatogrammen:

Meßgerät: Dual Ratemeter-Integrator LB 242 K,

Fa. Berthold, Wildbad.

Zählrohr: 4π -Doppelgasstromzählrohr LB 6200,

Fa. Berthold, Wildbad.

Dünnschicht-Scanner: LB 2721 mit automat. Abtastung,

Fa. Berthold, Wildbad.

Schreiber: Zweikanalschreiber 405 942,

Metrawatt GmbH, Nürnberg.

Zentrifugen:

Omega II 70 000, Heraeus-Christ, Osterode/Harz.

Zentrifugen (Fortsetzung):

Sorvall Superspeed RC 2-B

Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Connecticut, USA.

Rotixa 7000, Fa. Hettich, Tuttlingen.

Photometer PM4, Carl Zeiss, Oberkochen.

Homogenisator Typ 853 202, mit Glaskolben und Teflonstempel,
Fa. B. Braun, Melsungen.

Oxidizer 305 zur Stuhlverbrennung,

Packard Instrument Company, Inc., Illinois, USA.

Köttermann-Wasserbad mit Schütteleinrichtung, Typ 3047,
Fa. Köttermann KG, Hanigsen.

Labor-pH-Meter, Typ pH 27,

Knick-Berlin mit Einstabmeßkette, Schott & Gen, Mainz.

3.3. Methoden

3.3.1. Inkubationen

Versuchsanordnung:

Zur Bestimmung der Ring-A-Reduktion wurde mit dem 10 000Xg-Überstand bzw. dem 100 000Xg-Sediment und -Überstand gearbeitet; zur Messung der 17-Oxydation wurde der 24 500Xg-Überstand bzw. das -Sediment verwendet.

Die Tiere wurden durch Genickschlag betäubt und durch Halsschnitt entblutet; nach der Entnahme wurde die Leber in eisgekühlter 0.25 molarer Saccharoselösung gewaschen und im vierfachen Volumen 0.25 molarer Saccharoselösung unter Kühlung homogenisiert. Die Zellfraktionierungen wurden bei entsprechenden g-Werten durch Zentrifugation vorgenommen.

3.3.1.1. Inkubationen mit 10 000Xg-Überstand bzw.
100 000Xg-Überstand und -Sediment im
NADPH regenerierenden System (52,53):

Nachdem in den einzelnen Zellfraktionen der Protein-
gehalt photometrisch bestimmt wurde, wurden die Frak-
tionen mit 0.25 molarer Saccharoselösung auf die ge-
wünschte Konzentration eingestellt. Alle Inkubationen
wurden bei 37°C im Schüttelthermostaten unter Luft in
25ml-Erlenmeyerkolben mit Normschliff NS 14.5 durchge-
führt.

Verwendete Lösungen:

(a) Äthanolische Steroidlösung:

2 mg Testosteron/ml + 0.1 µCi 4-¹⁴C-Testosteron

2 mg Progesteron/ml + 0.1 µCi 4-¹⁴C-Progesteron

(b) Tris-Puffer:

Tris: $4.85 \cdot 10^{-3}$ mol/l, mit HCl auf pH 7.4
+ $2.42 \cdot 10^{-3}$ mol/l MgCl₂ 6H₂O

(c) G-6-P: $17.6 \cdot 10^{-3}$ mol/l

(d) NADP: $0.485 \cdot 10^{-3}$ mol/l

(e) G-6-PDH ⁺⁾ : 0.4g/l 3.3 molare (NH₄)₂SO₄-Lsg.

Inkubationsansatz (in folgender Reihenfolge pipettiert):

0.1 ml (a) mit Testosteron od. Progesteron
+2.0 ml (b)
+0.25 ml (c)
+0.25 ml (d)
+0.12 ml (e)

Start: +1.6 ml Leberpräparation (10 000Xg-Überst. bzw.
100 000Xg-Überst. od. -Sed.) ent-
sprechend 3 mg Leberprotein.

=====4.32 ml Gesamtvolumen

Die Inkubationsdauer ist jeweils in den betreffenden Ab-

⁺⁾ EC 1.1.1.49

bildungen angegeben. Zum Reaktionsstop wurde das Inkubationsmedium mit 4 ml Essigester versetzt und geschüttelt. Vor der Steroidextraktion wurde das Inkubationsmedium in 12ml-Zentrifugengläser mit Normschliff NS 14.5 quantitativ überführt und dreimal mit je 4 ml Essigester jeweils 10 Minuten geschüttelt; nach Zentrifugation von jeweils 10 Minuten bei 3000 U/min wurden die Essigesterphasen abgezogen und vereinigt; die vereinigten Extrakte wurden unter Stickstoff eingeengt.

3.3.1.2. Inkubationen zur Lokalisation einer NAD- und einer NADP-spezifischen 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase in der Leber (34) mit 24 500Xg-Überstand und -Sediment und Homogenat:

Die Leberpräparationen wurden vor der Inkubation nicht auf eine gewünschte Konzentration eingestellt, sondern unverdünnt zur Inkubation verwendet; der Proteingehalt der Ansätze wurde photometrisch bestimmt.

Verwendete Lösungen:

- (a) Wäßrige Steroidlösung:
32 mg Testosteron/l aqua bid.
+10 μ Ci 4-¹⁴C-Testosteron
- (b) Natriumpyrophosphat-Puffer:
80.298 g/l, pH 9.6
- (c) NAD⁺: 15 g/l
- (d) NADP⁺: 5 g/l

Inkubationsansatz (in folgender Reihenfolge pipettiert):

27.0 ml (a)
+15.0 ml (b)
+ 3.0 ml (c) od. (d)

Start: + 1.5 ml Leberpräparation

=46.5 ml Gesamtvolumen

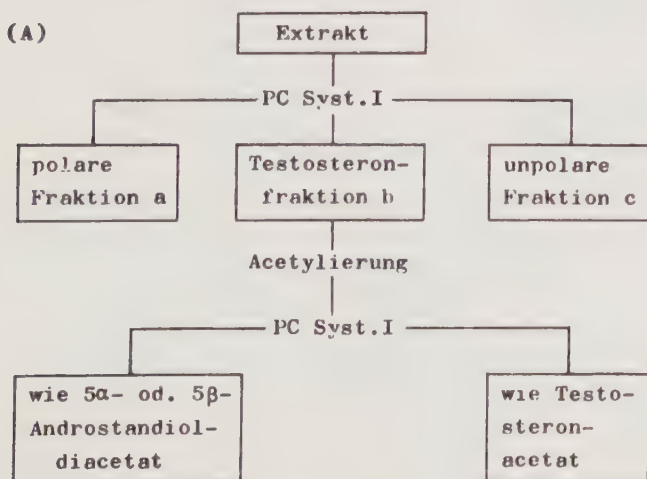
Die Reaktion wurde durch Zugabe der Leberpräparation gestartet; zur Beendigung der Reaktion wurden in Abständen von 5 Minuten jeweils 4 ml des Inkubationsansatzes entnommen und zum Reaktionsstop in einem Schliffglas NS 14.5 mit je 4 ml Äther/Chloroform (3/1,v/v) geschüttelt.

Zur Extraktion wurden die entnommenen 4 ml je dreimal mit 4 ml Äther/Chloroform (3/1,v/v) geschüttelt; nach Zentrifugation bei 3000 U/min wurden die Äther/Chloroform-Phasen abgezogen, vereinigt und unter Stickstoff zur Trockne gebracht.

Die Trockenrückstände der Steroidextrakte aus den Inkubationen wurden in Äthanol aufgenommen und quantitativ zur papier- bzw. dünn-schichtchromatographischen Auftrennung benutzt. 94-98% der eingesetzten ^{14}C -Aktivität konnten jeweils aus den Inkubationsansätzen extrahiert werden.

3.3.2. Chromatographische Auftrennung der Extrakte zur Bestimmung des Testosteronabbaus

Zur Ermittlung des Testosteronabbaus wurden die Extrakte entsprechend dem folgenden Schema (A) zunächst in PC System I vorgetrennt:



Wie aus Vorversuchen hervorging, enthielt die Testosteronfraktion b nach der ersten Chromatographie in PC System I einen nicht abtrennbaren, stark polaren Metaboliten; um eine reine Testosteronfraktion zu erhalten, wurde die Testosteronfraktion b eluiert, acetyliert und in PC System I rechromatographiert; wie aus Schema (A) hervorgeht, ließ sich von dem Testosteronacetat eine zweite Fraktion abtrennen. Aus den Ergebnissen der ersten und zweiten Chromatographie wurde der Testosteronabbau berechnet.

3.3.3. Rechnerische Bestimmung des Testosteronabbaus

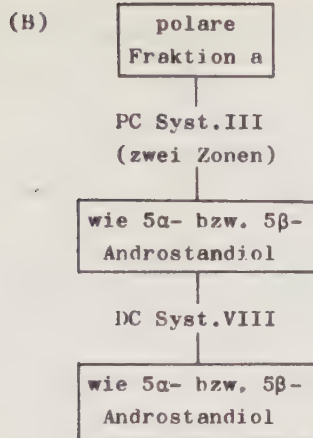
Die Aktivitätsverteilung der Chromatogramme wurde im Scanner mit angeschlossenem Integrator gemessen. Aus den Flächenverhältnissen der Aktivitätskurven des Testosteronacetats und der abgetrennten Metabolite wurde der Testosteronabbau bestimmt.

3.3.4. Chromatographische Charakterisierung des Testosterons und seiner Metabolite

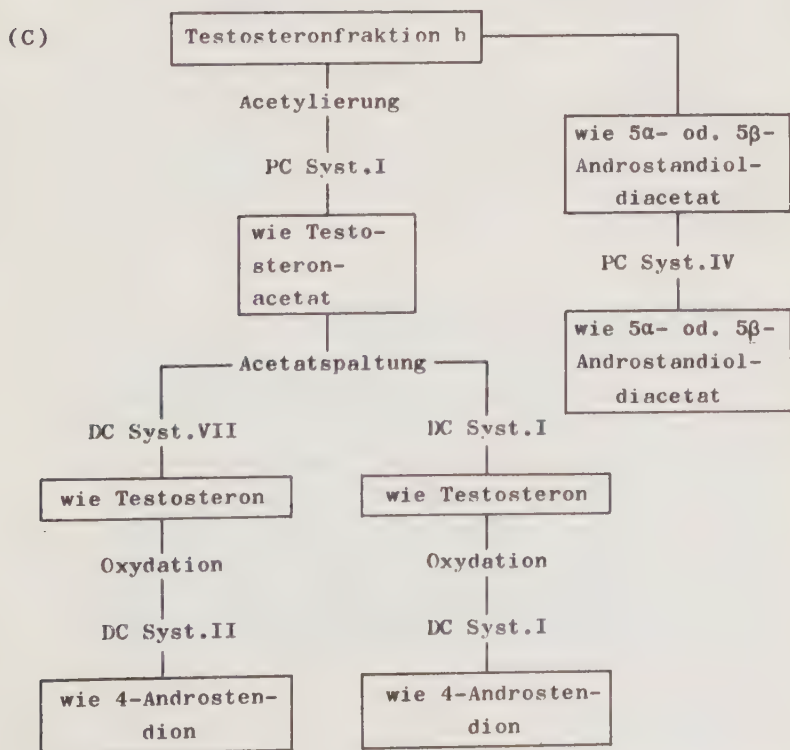
Die in Schema (A) dargestellten Trennungen dienten außer der quantitativen Bestimmung des Testosteronabbaus auch der Charakterisierung des Metabolitenspektrums. Die Charakterisierung erfolgte durch ständige Vergleiche mit authentischen Referenzsubstanzen.

Das Schema (B) zeigt die weitere Auftrennung und Charakterisierung der polaren Fraktion a (s.S.22).

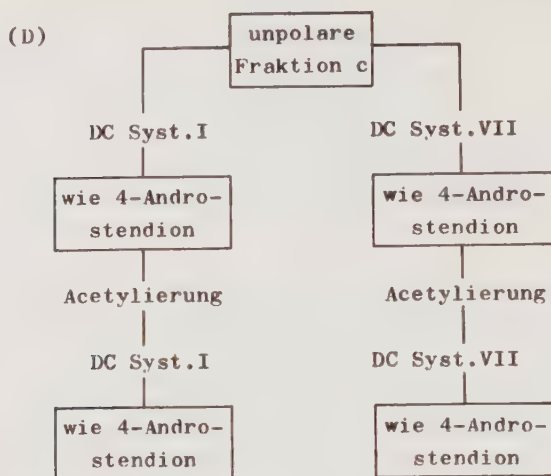
Nach Rechromatographie der polaren Fraktion a in PC System III ließen sich zwei verschiedene radioaktive Substanzen nachweisen, die sich beide wie Metabolite der 5 α - oder 5 β -Androstandiolreihe verhielten. Eine getrennte Rechromatographie der beiden Zonen in DC System VIII bestätigte das Ergebnis; Vorversuche hatten gezeigt, daß es sich bei beiden Substanzen um Metabolite handelt, die sich chromatographisch nach Acetylierung wie Androstandiol-diacetate verhalten.



Zur Charakterisierung bzw. Identifizierung der Testosteronzone b wurde nach folgendem Schema (C) verfahren:



Identifikation der unpolaren Fraktion c:



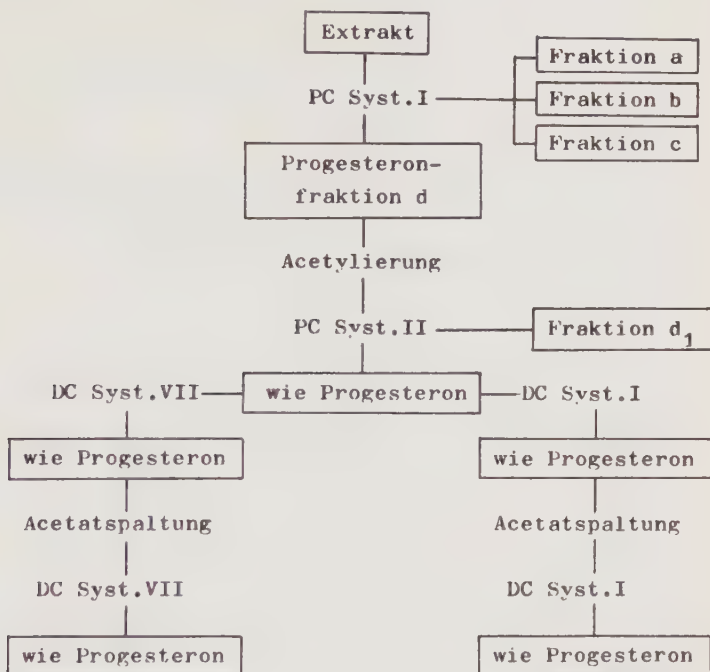
Die Testosteron- und 4-Androstendionfraktionen aus den Inkubationen zur Lokalisierung einer NAD^+ - und einer NADP^+ -spezifischen 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase⁺) wurden ebenso wie die oben beschriebenen Fraktionen charakterisiert.

3.3.5. Bestimmung des Progesteronabbaus

Entsprechend der Bestimmung des Testosteronabbaus wurde bei der Ermittlung des Progesteronabbaus verfahren. Die einzelnen Inkubationsextrakte wurden in PC System I vorgetrennt; aus der im Scanner gemessenen Aktivitätsverteilung wurde die prozentuale Verteilung auf Progesteronfraktion d und Metabolite errechnet. Nach Elution und Acetylierung der Progesteronfraktion d wurde in PC System II rechromatographiert und aus der so erhaltenen Aktivitätsverteilung der Progesteronabbau ermittelt.

⁺) S.S.19, 3.3.1.2.

Im folgenden Schema ist die Charakterisierung des Progesterons dargestellt:



Die entstandenen Metabolite a,b,c und d₁ konnten aufgrund geringer Aktivität nach chromatographischen Vergleichen mit authentischen Referenzsubstanzen nur grob charakterisiert werden.

3.3.6. Chromatographiesysteme

a) Papierchromatographie

Die Chromatographien wurden in einem klimatisierten Raum bei 21°C absteigend ausgeführt.

Die Mischungsverhältnisse sind in Volumenteilen angegeben.

- PC System I : Cyclohexan/Methanol/Wasser
(100+85+15) Bush A₂
- PC System II : Isooctan/Methanol/Wasser
(10+10+1)
- PC System III : Cyclohexan/Dimethylformamid
- PC System IV : Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser
(1+1+1+1)

b) Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographien wurden bei Raumtemperatur aufsteigend ausgeführt.

Die Mischungsverhältnisse sind in Volumenteilen angegeben.

- DC System I : Benzol/Essigester/Äthanol
(3+4+1)
- DC System II : Essigester/Benzol (1+2 und 1+3)
- DC System III : Aceton/Äthanol (6+2)
- DC System IV : Essigester/Benzol (1+1 und 2+1)
- DC System V : Cyclohexan/Äthanol (6+4)
- DC System VI : Chloroform/Aceton (9+1)
- DC System VII : Essigester/Benzol (1+1 und 1+3)
- DC System VIII : Äther/Essigester (1+1)

3.3.7. Radioaktivitätsmessung

- a) In organischen Lösungen: 0.1 ml Lösung + 10 ml Insta-Gel.
- b) In wäßrigen Lösungen (Harn bzw. Inkubationsmedium):
1.0 ml Lösung + 10 ml Insta-Gel.
- c) Im Stuhl⁺⁾ : Eine definierte Menge von gefriergetrocknetem und pulverisiertem Stuhl wurde im gasdicht verschlossenen System in Sauerstoffatmosphäre verbrannt; Absorption des ¹⁴CO₂ erfolgte durch 3 ml Äthanolamin in 7.5 ml Methanol. Nach Beendigung der Absorption wurden 9.5 ml Szintillatorlösung (4 g POPOP und 55 g PPO in 5 l Toluol) hinzugefügt und die Probe wurde im Szintillationspektrometer gemessen.
- d) Beim Veratmungsversuch mit Meerschweinchen wurden

⁺⁾ Stuhlverbrennung
im Oxydizer 305

- 5 ml des Absorptionsmediums (12% Äthanolamin in Methanol) + 15 ml Insta-Gel gemessen.
- e) Auf Papier- und Dünnschichtchromatographien: am Scanner.

3.3.8. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry (54) durchgeführt.

Ansatz: 0.2 ml Proteinlösung

+ 1.0 ml alkal. Kupferlösung

(50 ml 2% Na_2CO_3 in 0.1N NaOH

+ 1 ml 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1% Na-tartrat

15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

+ 0.1 ml Phenolreagenz (1 ml Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu + 1.1 ml H_2O)

gut durchmischen, 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

+ 2.0 ml H_2O

= 3.3 ml Volumen des Meßwertes

Es wurde photometrisch bei 750 $\text{m}\mu$ gegen den Leerwert der Reagentien gemessen. Zur Ermittlung der Eichkurve wurden Doppelwerte mit 10-100 γ Rinderserumalbumin in 0.2 ml H_2O pipettiert.

3.3.9. Färbung von Steroiden auf Papier- und Dünnschichtchromatogrammen

a) Papierchromatographie:

nach Zimmermann (55): Die Chromatogramme wurden mit einer Mischung aus 1% m-Dinitrobenzol in Äthanol und 30-40% KOH (4+1) angesprüht und bei 75°C getrocknet; Ketone erschienen blau-violett.

mit Phosphormolybdänsäure (56,57): Die Streifen wurden mit einer Lösung von 10% Phosphormolybdänsäure in Äthanol angesprüht und bei 90°C getrocknet; Dirole erschienen schwarz.

b) Dünnschichtchromatographie (58):

Die Platten wurden mit 70% Schwefelsäure in Äthanol angesprüht und bei 100°C getrocknet; die Steroide erschienen als farbige Flecken.

3.3.10. Mikroreaktionen

a) Acetylierung:

Die Trockenrückstände der Extrakte wurden in 0.2 ml Pyridin gelöst und mit 0.2 ml Essigsäureanhydrid versetzt; die Ansätze wurden ca. 16 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach Zugabe von 5 ml Methanol unter Stickstoff getrocknet.

b) Acetatspaltung:

Das Acetat wurde mit einer gesättigten Lösung von K_2CO_3 in Äthanol bei 55°C versetzt; die Lösung wurde 3 Stunden bei 55°C gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung unter Stickstoff zur Trockne eingengt und mit 5 ml Wasser versetzt; die wäßrige Lösung wurde dreimal mit Essigester extrahiert.

c) Oxydation (59):

Der trockene Steroidextrakt wurde mit Pyridin und Butylchromat-Reagenz (jeweils 100µl pro 500γ Steroid) versetzt und ca. 16 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt; nach Zugabe von gesättigter äthanolischer Zitronensäurelösung und Ansäuern mit H_2SO_4 wurde mit Chloroform extrahiert; der Extrakt wurde mit Wasser, 10% Natriummetabisulfit und NaOH gewaschen und unter Stickstoff eingengt.

3.3.11. Versuch zur Ausscheidung von 4- ^{14}C -Testosteron bei Meerschweinchen über Harn und Stuhl

Zwei männliche und zwei weibliche Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von ca. 450 g wurden 7 Tage einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten, um sich an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen. Am achten Tag erhielten die

Tiere 0.1 mg ($\approx 18 \mu\text{Ci}$) gereinigtes 4- ^{14}C -Testosteron in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 5% Äthanol intraperitoneal injiziert; in den Stoffwechselkäfigen wurden Harn und Stuhl getrennt aufgefangen. Zur Vermeidung des Keimwachstums in den Harnen wurden 5 ml Penicillinlösung (1000 I.E./ml) in die Auffanggefäße gegeben. Um die ausgeschiedene Aktivität quantitativ zu gewinnen, wurden die Auffanggefäße mit Wasser nachgespült; Harn und Spülwasser wurden jeweils vereinigt. Die ^{14}C -Ausscheidung wurde während der ersten 16 Stunden in Abständen von 4 Stunden bestimmt, wobei 1 ml in 10 ml Insta-Gel gemessen wurde. Die Ermittlung der ^{14}C -Ausscheidung über den Stuhl erfolgte ebenfalls in Abständen von 4 Stunden durch Verbrennung von 100 mg gefriergetrocknetem und pulverisiertem Stuhl.

Nach der Radioaktivitätsmessung wurden die einzelnen Harne und Stühle bei -25°C aufbewahrt.

Aufarbeitung der Harne:

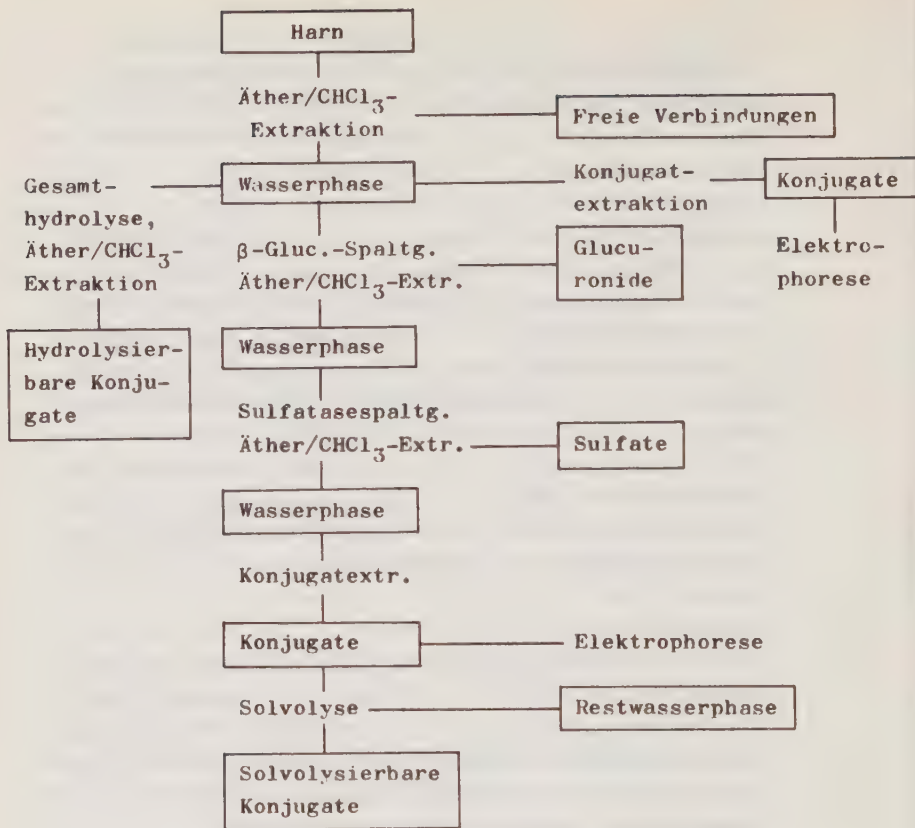
Die in den ersten 28 Stunden von männlichen und weiblichen Meerschweinchen erhaltenen Harne wurden nach Geschlechtern getrennt zur Differenzierung der ^{14}C -Aktivität vereinigt; nach Messung der Gesamtradioaktivität wurden die Harne von Männchen und Weibchen getrennt aufgearbeitet (s. Schema S. 29).

Steroidextraktion:

- a) Freie Steroide wurden aus dem Harn dreimal mit Äther/Chloroform (3/1, v/v) extrahiert.
- b) Steroidkonjugate wurden nach Extraktion der freien Steroide aus der verbliebenen Wasserphase extrahiert, indem Ammoniumsulfat (50g/100ml) hinzugegeben wurde und dreimal mit gleichem Volumen Äther/Äthanol (3/1, v/v) extrahiert wurde (60).

Konjugatspaltung:

- a) Gesamthydrolyse: Ein aliquoter Teil der Wasserphase wurde nach Extraktion der freien Steroide mit 0.2 Volumenteilen konzentrierter Salzsäure versetzt und



Schematische Darstellung zur Differenzierung der ^{14}C -Aktivität in den Harnen von männlichen und weiblichen Meerschweinchen.

2 Stunden am Rückfluß gekocht.

- b) β -Glucuronidasespaltung: Ein aliquoter Teil der Wasserphase wurde nach Extraktion der freien Steroide mit Natriumacetat 0.2-molar gemacht und auf pH 4.8 eingestellt; nach Zugabe von 500 F.E. β -Glucuronidase/ml und 100 I.E. Penicillin/ml wurde 48 Stunden bei 37°C

inkubiert; nach 24 Stunden erfolgte erneute Zugabe von 500 F.E. β -Glucuronidase/ml.

- c) Sulfatasespaltung: Ein aliquoter Teil der Wasserphase wurde nach β -Glucuronidasespaltung mit Natriumacetat 0.5-molar gemacht und auf pH 5.0 eingestellt; nach Zugabe von 5000 E Sulfatase/ml und 100 I.E. Penicillin/ml wurde 48 Stunden bei 37°C inkubiert; nach 24 Stunden erfolgte erneute Zugabe von 5000 E Sulfatase/ml.
- d) Solvolyse: Die restliche Wasserphase wurde nach Zusatz von 50% Ammoniumsulfat dreimal mit Äther/Äthanol (3/1, v/v) extrahiert (60); der eingeeengte Extrakt wurde in 50 ml Essigester aufgenommen und mit 0.5 ml Perchlorsäure versetzt; nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 37°C wurden 20 ml Wasser, 30 ml KOH (10%) und 20 ml Essigester hinzugefügt; die Hydrolyse der bei der Solvolyse entstandenen Steroidacetate erfolgte mit Kaliumcarbonat (gesättigte Lösung in Äthanol) bei einer Inkubation von 2 Stunden bei 55°C.

Die Konjugattrennung wurde mit Papierelektrophorese auf Elektrophoresepapier Macherey & Nagel MN 214 in 2n-Essigsäure bei 3.7 V/cm durchgeführt; die Laufzeit betrug 15 Stunden bei Raumtemperatur.

4. Ergebnisse

4.1. Testosteronabbau im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Ratten, Mäuse, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen

4.1.1. Untersuchungen mit Lebergewebe der Ratte

Die Abbildung 1 zeigt den Testosteronumsatz im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Ratten in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons bzw. in nMol/mg Leberprotein; Testosteronkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 693.4 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml.

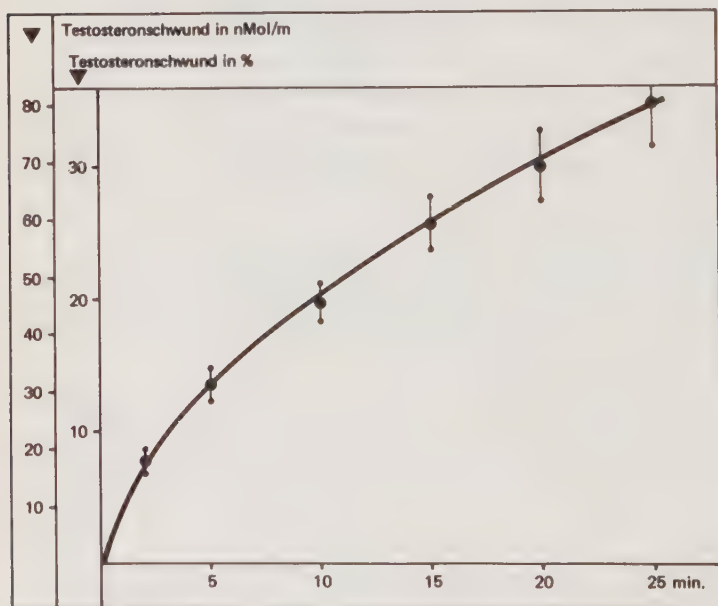


Abb. 1: Testosteronschwund im 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Ratten; Substratkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 693.4 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml, (n=9).

Das Scannerdiagramm in Abbildung 2 zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium nach Inkubation von 25 Minuten.

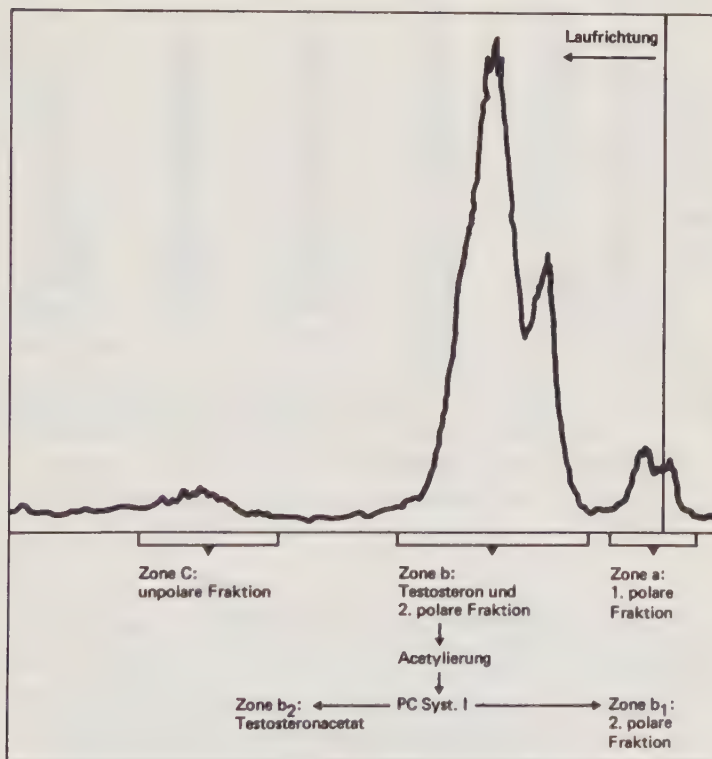


Abb. 2: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (25 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst. I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand aus der Leber der männlichen Ratte.

Nach Acetylierung wurde die Zone b in PC System I rechromatographiert, wobei sie sich in die Zonen b₁ und

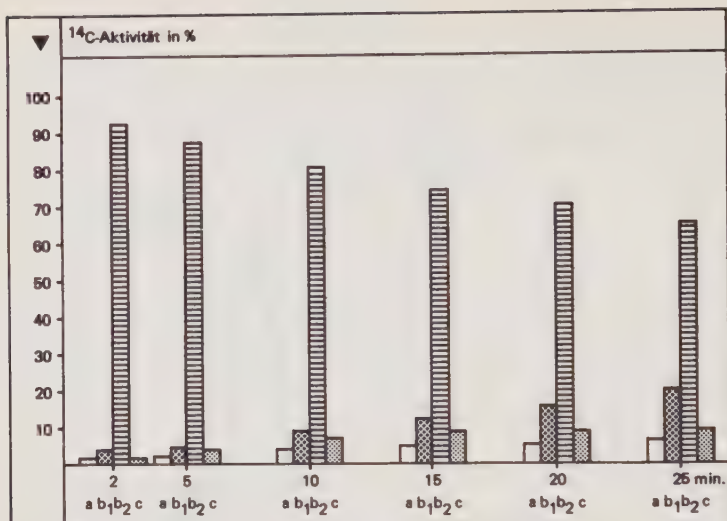


Abb. 3: Prozentualer Anteil des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von 4- ^{14}C -Testosteron mit 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Ratten.

b_2 auftrennte. Aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens sind die einzelnen Zonen charakterisiert worden:

Zone a : 1. polare Fraktion, verhält sich wie ein Reduktionsprodukt des Testosterons aus der 5α - bzw. 5β -Androstandiol-Reihe.

Zone b_1 : 2. polare Fraktion, verhält sich als freie Verbindung ebenfalls wie ein Reduktionsprodukt des Testosterons aus der 5α - bzw. 5β -Androstandiol-Reihe.

Zone b_2 : Testosteronacetat, diese Fraktion wurde nach Acetatspaltung in weiteren chromatographischen Vergleichen als Testosteron identifiziert (s.S.21).

Zone c : Unpolare Fraktion, diese Fraktion wurde in weiteren chromatographischen Vergleichen als 4-Androstendion, also als Oxydationsprodukt des Testosterons, identifiziert (s.S.23).

In Abbildung 3 ist der Schwund des Testosterons und die gleichzeitige Zunahme seiner Metabolite gezeigt; die Angaben wurden als prozentuale Anteile des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt-¹⁴C-Aktivität berechnet.

Aus der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Ratten ergibt sich ein Testosteronschwund von ca. 19% pro 5 Minuten (Abb.1).

4.1.2. Untersuchungen mit Lebergewebe der Maus

Die Abbildung 4 (S.35) zeigt den Testosteronumsatz im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Mäuse in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons bzw. in nMol/mg Leberprotein; Testosteronkonzentration: 200 µg/4.32ml = 693.4 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml.

Das Scannerdiagramm in Abbildung 5 (S.36) zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium nach Inkubation von 25 Minuten.

Die Zone b wurde nach Acetylierung in PC System I rechromatographiert, wobei sie sich in die Zonen b₁ und b₂ auftrennte. Aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens konnten die Zonen wie folgt charakterisiert werden (Hierzu

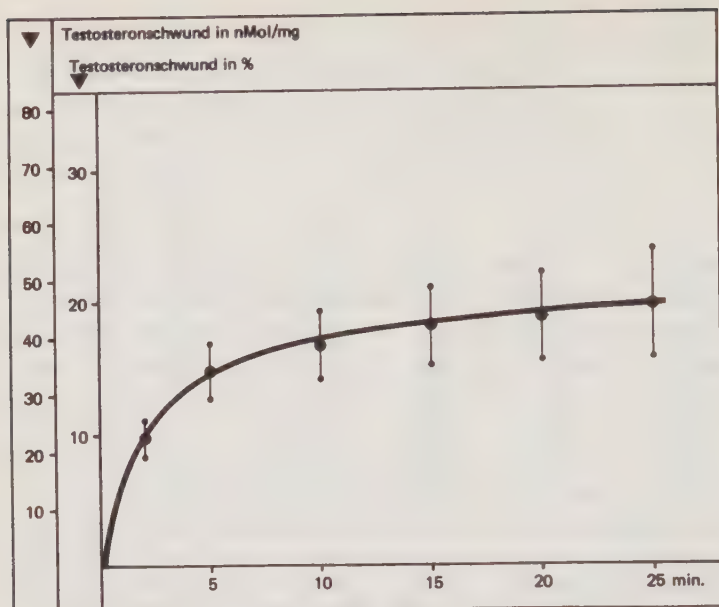


Abb. 4: Testosteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Mäuse; Substratkonzentration: $200 \mu\text{g}/4.32 \text{ ml} = 693.4 \text{ nMol}/4.32 \text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3 \text{ mg}/4.32 \text{ ml}$, ($n=13$).

siehe "Methoden", S.21):

Zone a : 1. polare Fraktion, verhält sich wie ein Reduktionsprodukt des Testosterons aus der 5α - bzw. 5β -Androstandiolreihe.

Zone b_1 : 2. polare Fraktion, verhält sich als freie Verbindung ebenfalls wie ein Reduktionsprodukt des Testosterons aus der 5α - bzw. 5β -Androstandiolreihe.

Zone b_2 : Testosteronacetat, diese Fraktion wurde nach Acetatspaltung in weiteren chromatographischen Vergleichen als Testosteron

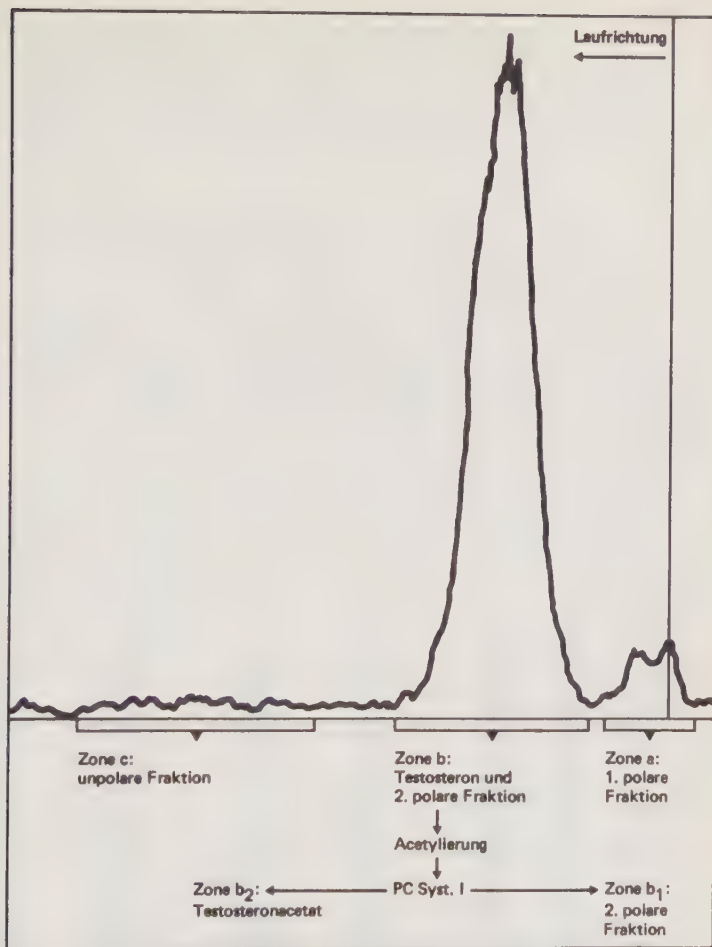


Abb. 5: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (25 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst. I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand aus der Leber der männlichen Maus.

identifiziert.

Zone c : Unpolare Fraktion, diese Fraktion wurde in weiteren chromatographischen Vergleichen als 4-Androstendion, also als Oxydationsprodukt des Testosterons, identifiziert.

Die Abbildung 6 gibt die Abnahme des Testosterons und die gleichzeitige Zunahme seiner Metabolite im 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Mäuse wieder; die Angaben wurden als prozentuale Anteile des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität berechnet.

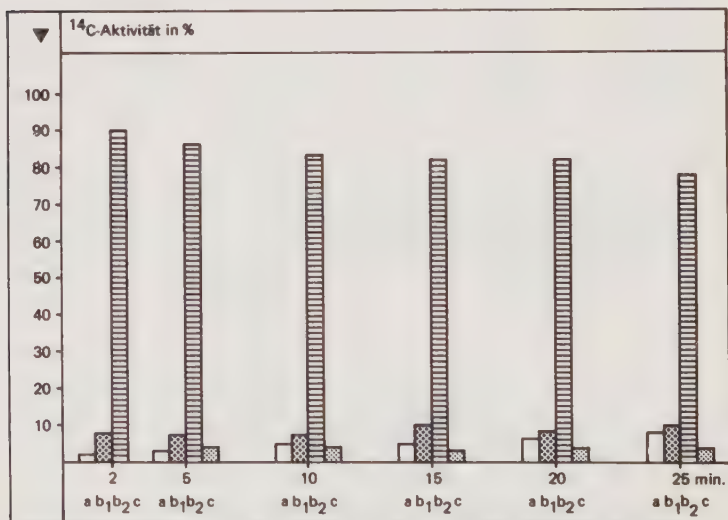


Abb. 6: Prozentualer Anteil des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von 4- ^{14}C -Testosteron mit 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Mäuse.

Aus der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des prozentualen Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Mäuse ergibt sich ein Testosteronschwund von ca. 48% pro 5 Minuten.

4.1.3. Untersuchungen mit Lebergewebe des Streifenhamsters

Die Abbildung 7 zeigt den Testosteronumsatz im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Streifenhamster in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons bzw. in nMol/mg Leberprotein; Testosteronkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 693.4 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml.

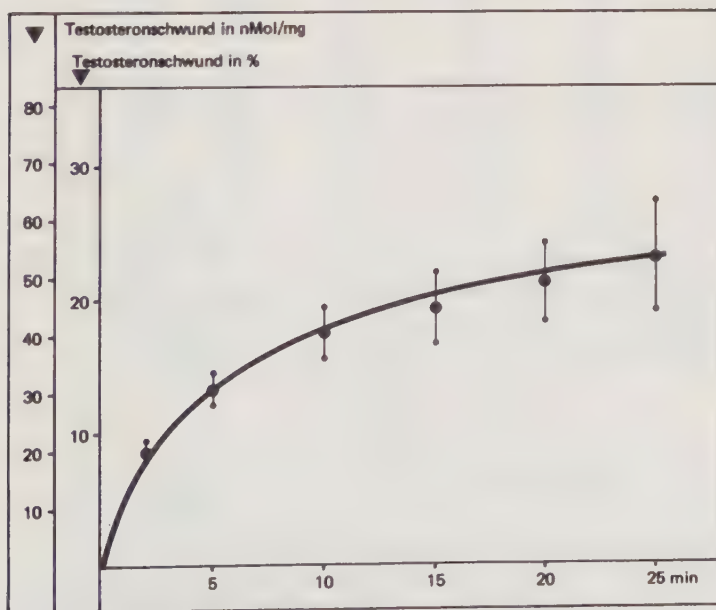


Abb. 7: Testosteronschwund im 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Ratten; Substratkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 693.4 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml, (n=9).

Das Scannerdiagramm in Abbildung 8 zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium nach Inkubation von 25 Minuten.

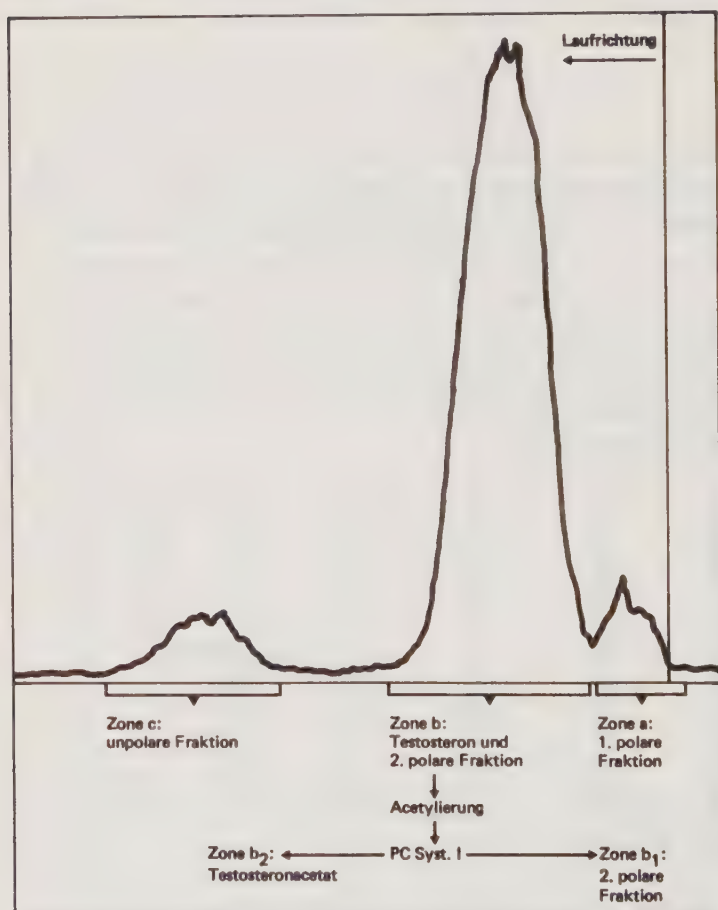


Abb. 8: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (25 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst. I und die weitere Auftrennung zur Bestimmung des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Streifenhamster.

In Abbildung 9 ist der Schwund des Testosterons und die gleichzeitige Zunahme seiner Metabolite gezeigt; die Angaben wurden als prozentuale Anteile des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität berechnet.

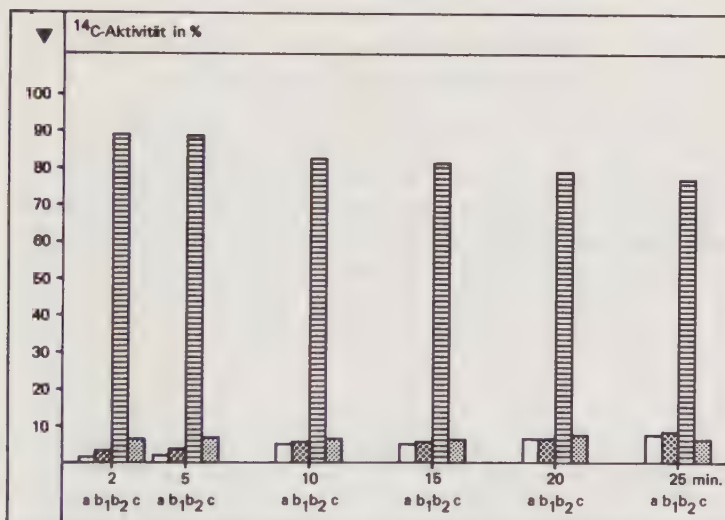


Abb. 9: Prozentualer Anteil des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von 4- ^{14}C -Testosteron mit 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Streifenhamster.

Nach Acetylierung wurde die Zone b in PC System I rechromatographiert, wobei sie sich in die Zone b₁ und die Zone b₂ auf trennte. Aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens sind die einzelnen Zonen wie folgt charakterisiert worden (Hierzu siehe "Methoden", S.21):

Zone a : 1. polare Fraktion, verhält sich wie ein Reduktionsprodukt des Testosterons aus der 5 α - bzw. 5 β -Androstandiolreihe.

Zone b_1 : 2. polare Fraktion, verhält sich wie ein Reduktionsprodukt des Testosterons aus der 5α - bzw. 5β -Androstandiolreihe.

Zone b_2 : Testosteronacetat, diese Fraktion konnte nach Acetatspaltung als Testosteron identifiziert werden.

Zone c : Unpolare Fraktion, diese Fraktion wurde als 4-Androstendion identifiziert.

Aus der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Streifenhamster ergibt sich ein Testosteronschwund von ca. 34% pro 5 Minuten.

4.1.4. Untersuchungen mit Lebergewebe des Meerschweinchens

Bei der Inkubation von Testosteron mit dem 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Meerschweinchen im NADPH-regenerierenden System wurde nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten ein Testosteronumsatz von ca. 2% gemessen. Da der entstandene Metabolit sich in PC System I wie 4-Androstendion verhielt (Er konnte wegen zu geringer Aktivität nicht identifiziert werden.), wurde der Schluß gezogen, daß die Meerschweinchenleber unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage ist, Testosteron zu reduzieren und Oxydationsprodukte nur in ganz geringem Maße bildet. Um einen generellen Überblick über die Fähigkeit des Meerschweinchens zu bekommen, Reduktionsprodukte des Testosterons zu bilden, wurden die Ausscheidung und das Metabolitenspektrum von 4- 14 C-Testosteron nach intraperitonealer Injektion untersucht (Hierzu siehe 4.3., S.98).

Im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Meer-
schweinchen ist bei Verwendung des NADPH-regenerie-
renden Systems praktisch kein Testosteronumsatz nach-
weisbar.

4.1.5. Untersuchungen mit Lebergewebe männlicher Kanin- chen (Substrat: Testosteron)

Die Abbildung 10 (S.43) zeigt den Testosteronumsatz im
10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen in Pro-
zent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons bzw. in
nMol/mg Leberprotein; Testosteronkonzentration:
200 µg/4.32 ml = 46.3 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration:
3 mg/4.32 ml.

Das Scannerdiagramm in Abbildung 11 (S.44) gibt als Bei-
spiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer
Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubations-
medium nach Inkubation von 25 Minuten wieder.

Nach Acetylierung wurde die Zone b in PC System I rechro-
matographiert, wobei sie einheitlich blieb. Aufgrund ih-
res chromatographischen Verhaltens sind die einzelnen
Zonen charakterisiert worden (Hierzu siehe "Methoden", S.21):

Zone a : polare Fraktion, verhält sich wie ein Re-
duktionsprodukt des Testosterons aus der
5α- bzw. 5β-Androstandiolreihe.

Zone b₁: Testosteronacetat, konnte nach Acetat-
spaltung durch chromatographische Ver-
gleiche als Testosteron identifiziert
werden.

In Abbildung 12 (S.45) ist der Schwund des Testosterons
und die gleichzeitige Zunahme seiner Metabolite gezeigt;
die Angaben wurden berechnet als prozentuale Anteile des

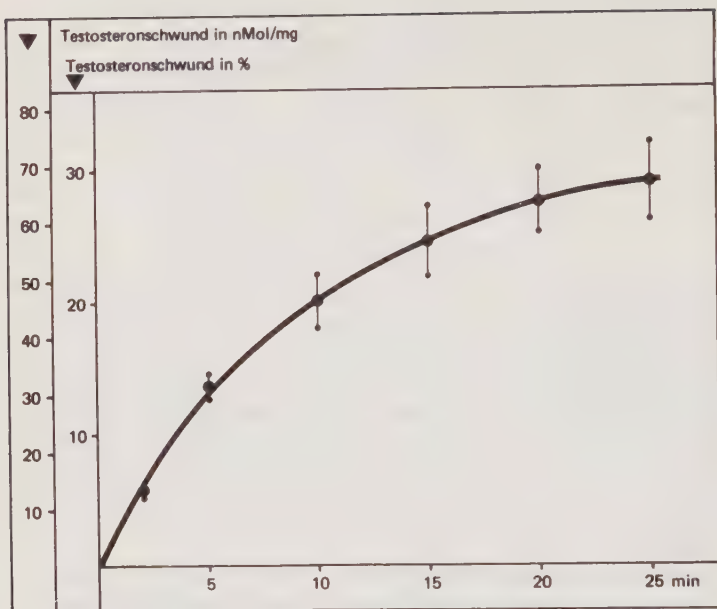


Abb.10: Testosteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen; Substratkonzentration: $200 \mu\text{g}/4.32 \text{ ml} = 693.4 \text{ nMol}/4.32 \text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3 \text{ mg}/4.32 \text{ ml}$, ($n=3$).

Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität.

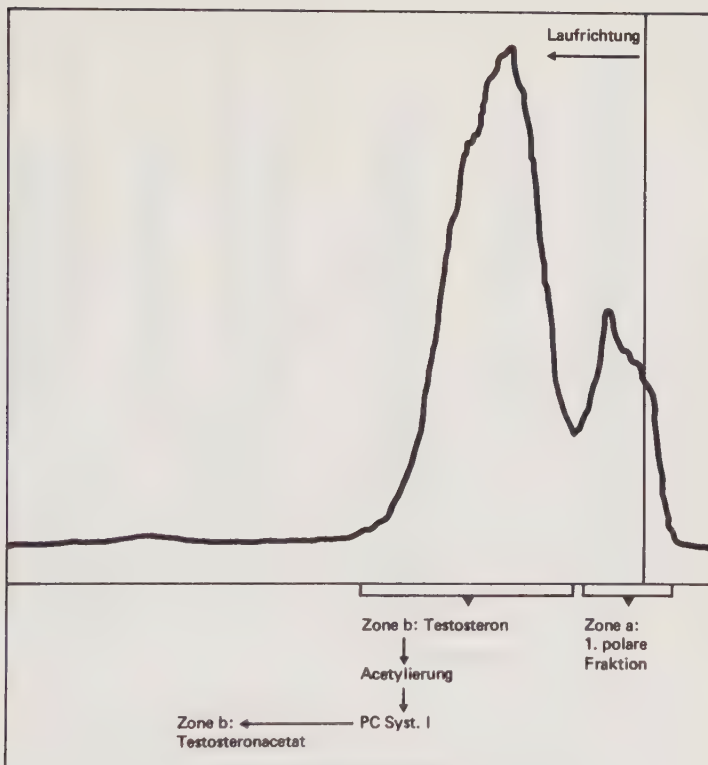


Abb.11: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (25 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst.I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen.

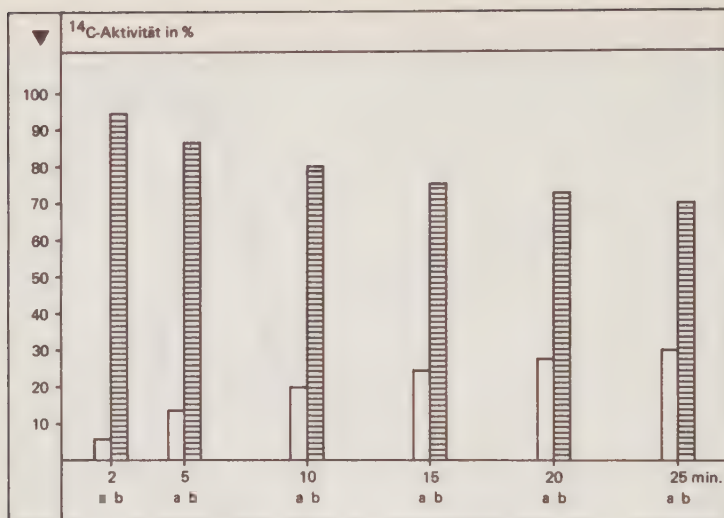


Abb.12: Prozentualer Anteil des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität nach Inkubation mit 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Kaninchen.

Aus der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen ergibt sich ein Testosteronschwund von ca. 23% pro 5 Minuten.

Zur Lokalisation der am Testosteronabbau beteiligten Enzymsysteme in der Zelle der männlichen Kaninchenleber wurde Testosteron im NADPH-regenerierenden System mit dem 10 000Xg-Überstand und dem 100 000Xg-Sediment und -Überstand inkubiert. Um die Frage beantworten zu können, ob die Trennung von Cytoplasma und Mikrosomenfraktion Ein-

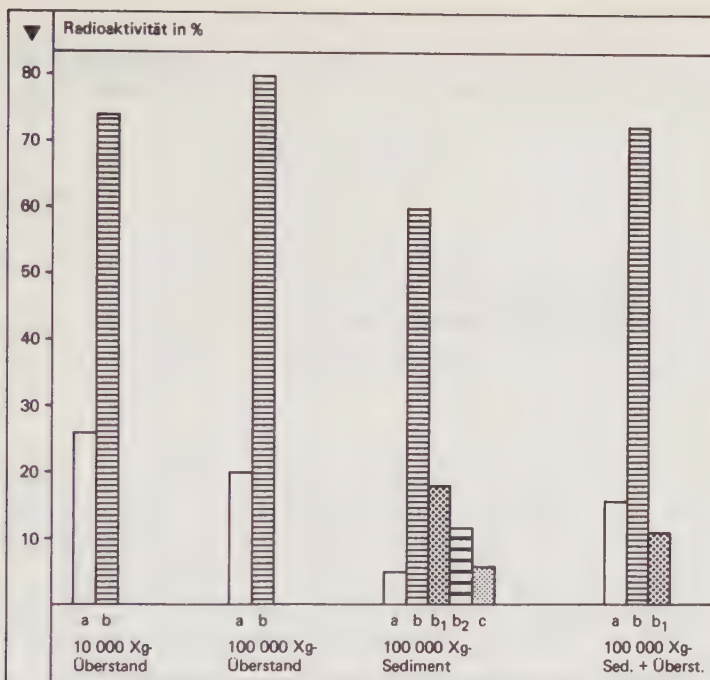


Abb.13: Prozentuale Verteilung der ¹⁴C-Aktivität auf Testosteron und seine Metabolite nach Inkubation von ¹⁴C-Testosteron mit verschiedenen Zellfraktionen der Leber männlicher Kaninchen; Inkubationsdauer: 25 Minuten, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml, Testosteronkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 693.4 nMol/4.32 ml; (n=2)
a, b₁, b₂: Reduktionsprodukte des Testosterons, b: Testosteron, c: 4-Androstendion.

fluß auf den Testosteronabbau hat, wurden Inkubationen durchgeführt, bei denen 100 000Xg-Sediment und -Überstand nach erfolgter Trennung zu gleichen Teilen hinzugegeben wurden. Die Inkubationen wurden als Doppelwerte

bei gleicher Zeit von 25 Minuten mit dem Lebergewebe von zwei Tieren durchgeführt. Der Einsatz betrug 3 mg Leberprotein und 200 μg ($= 693.4 \text{ nMol}$) pro Ansatz (4.32 ml). Die Abbildung 13 (S.46) gibt den Anteil von Testosteron und Metaboliten in Prozenten der ^{14}C -Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten wieder. Die Metabolite a, b_1 und b_2 wurden chromatographisch als Reduktionsprodukte des Testosterons charakterisiert. Die Substanz b wurde als unverändertes Testosteron und die Substanz c als 4-Androstendion identifiziert.

Bei der Inkubation von ^{14}C -Testosteron mit dem 10 000Xg- bzw. 100 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen ergibt sich qualitativ und quantitativ annähernd das gleiche Metabolitenspektrum; bei der Inkubation mit dem 100 000Xg-Sediment treten zwei weitere Reduktionsprodukte (b_1 und b_2) und ein Oxydationsprodukt (c) des Testosterons auf; enthält der Inkubationsansatz zu gleichen Teilen 100 000Xg-Überstand und -Sediment, so läßt sich lediglich ein Reduktionsprodukt (b_1) des Testosterons nachweisen.

4.1.6. Untersuchungen mit Lebergewebe weiblicher Kaninchen (Substrat: Testosteron)

Die Abbildung 14 zeigt den Testosteronumsatz im 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons bzw. in nMol/mg Leberprotein; Testosteronkonzentration: $200 \mu\text{g}/4.32 \text{ ml} = 693.4 \text{ nMol}/4.32 \text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3 \text{ mg}/4.32 \text{ ml}$.

Das Scannerdiagramm in Abbildung 15 (S.49) zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubations-

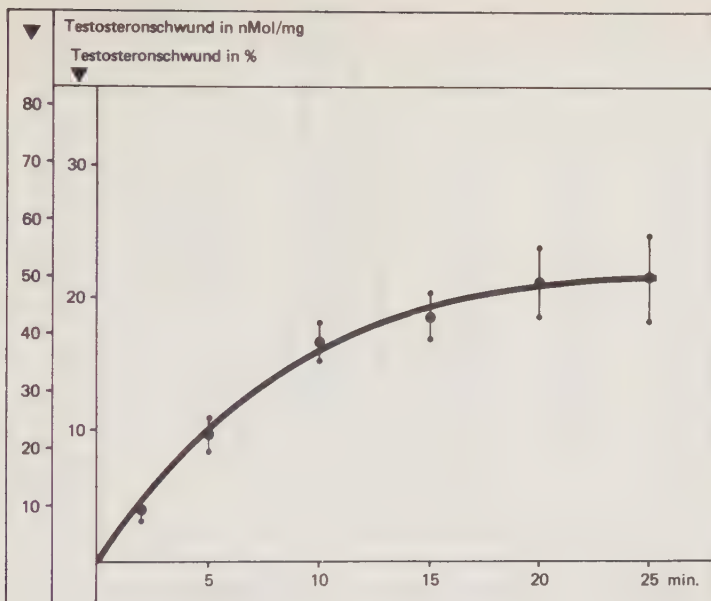


Abb.14: Testosteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen; Testosteronkonzentration: $200 \mu\text{g}/4.32 \text{ ml} = 693.4 \text{ nMol}/4.32 \text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3 \text{ mg}/4.32 \text{ ml}$ ($n=3$).

medium nach Inkubation von 25 Minuten.

Nach Acetylierung wurde die Zone b in PC System I rechromatographiert, wobei sie einheitlich blieb. Aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens sind die einzelnen Zonen charakterisiert worden:

Zone a : polare Fraktion, verhält sich wie ein Reduktionsprodukt aus der 5α - bzw. 5β -Androstandiolreihe.

Zone b_1 : Testosteronacetat, wurde nach Acetat-spaltung als unverändertes Testosteron identifiziert.

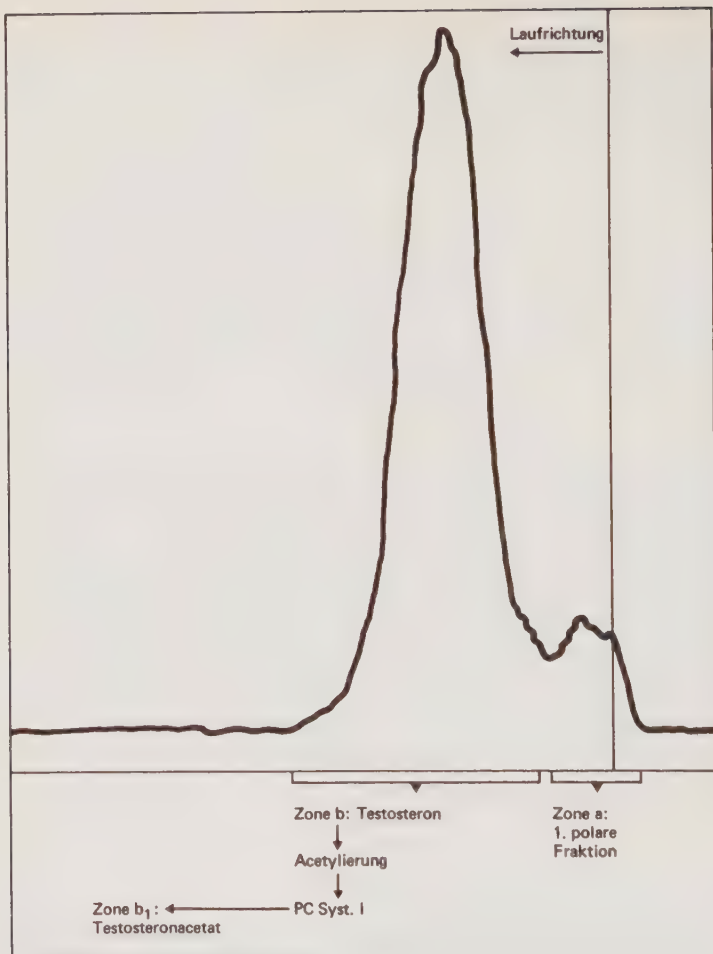


Abb.15: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (25 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst.I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen.

In Abbildung 16 (S.50) ist der Schwund des Testosterons

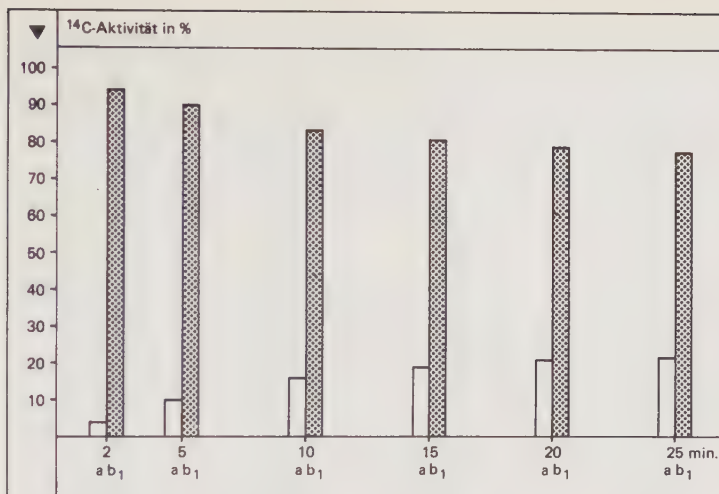


Abb.16: Prozentualer Anteil des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität nach Inkubationen von 4- ^{14}C -Testosteron mit dem 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen.

und die gleichzeitige Zunahme seiner Metabolite gezeigt; die Angaben wurden als prozentuale Anteile des Testosterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität berechnet.

Aus der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des prozentualen Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen ergibt sich ein Testosteronschwund von ca. 14% pro 5 Minuten.

Zur intrazellulären Lokalisation der am Testosteronabbau beteiligten Enzyme der weiblichen Kaninchenleber wurde Testosteron im NADPH-regenerierenden System mit dem 10 000Xg-Überstand, dem 100 000Xg-Überstand sowie dem 100 000Xg-Sediment inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 25 Minuten und es wurden 3 mg Leberprotein eingesetzt.

Nach Abbildung 17 (S.52) ist der Testosteronschwund im 100 000Xg-Sediment um ca. 12% größer als in den übrigen Fraktionen. Die Metabolite a und b_1 wurden als Reduktionsprodukte des Testosterons charakterisiert. Die Substanz b wurde als unverändertes Testosteron und die Substanz c als 4-Androstendion identifiziert.

Bei der Inkubation von 4- 14 C-Testosteron mit dem 10 000Xg- bzw. 100 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen ergibt sich qualitativ und quantitativ das gleiche Metabolitenspektrum; bei der Inkubation mit dem 100 000Xg-Sediment treten ein weiteres Reduktionsprodukt (b_1) und ein Oxydationsprodukt (c) des Testosterons auf; enthält der Inkubationsansatz zu gleichen Teilen 100 000Xg-Überstand und -Sediment, so läßt sich lediglich ein weiteres Reduktionsprodukt (b_1) des Testosterons nachweisen.

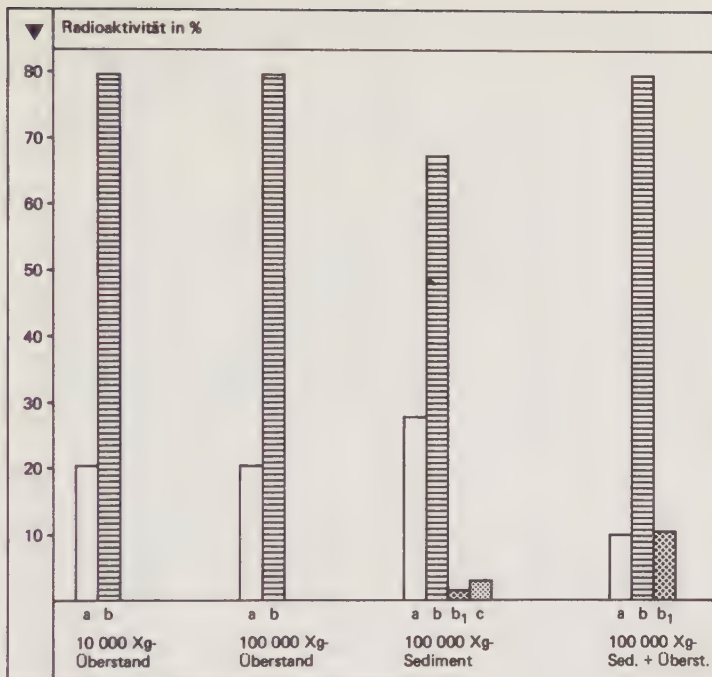


Abb.17: Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität auf Testosteron und seine Metabolite nach Inkubation von 4- ^{14}C -Testosteron mit verschiedenen Zellfraktionen der Leber weiblicher Kaninchen. Inkubationsdauer: 25 Minuten
a, b_1 : Reduktionsprodukte des Testosterons, b: Testosteron, c: 4-Androstendion.

4.1.7. Untersuchungen zum Progesteronstoffwechsel mit Lebergewebe männlicher Kaninchen

Außer der Frage nach der Lokalisation der Enzyme, die die Δ^4 -3-Keto-Gruppierung reduzieren, sollte in orientierenden Versuchen die Substratspezifität dieser Enzyme festgestellt werden.

Da das Kaninchen als Modell für Gestagentests besondere Bedeutung hat, wurde als Substrat für weitere Untersuchungen das Progesteron gewählt, das die gleiche Ring-A-Struktur besitzt wie das Testosteron. Entsprechend den Bedingungen, die für die Inkubationen mit Testosteron als Substrat gelten, wurden Inkubationen mit Gewebepräparationen der männlichen und weiblichen Kaninchenleber und Progesteron als Substrat durchgeführt.

Die Abbildung 18 (S.54) zeigt den Progesteronumsatz im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Progesterons bzw. in nMol/mg Leberprotein; Progesteronkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 635.98 nMol/4.32 ml.

Das Scannerdiagramm in Abbildung 19 (S.55) zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium nach chromatographischer Auftrennung in PC System I nach einer Inkubation von 25 Minuten.

Die Substanz d_2 wurde als unverändertes Progesteron identifiziert. Wegen der niedrigen ^{14}C -Aktivität konnten die entstandenen Metabolite nur charakterisiert werden (Hierzu siehe "Methoden", S.23):

Zone a : wurde chromatographisch in vier Zonen getrennt, die sich wie vollständig reduzierte Pregnandiole verhielten.

Zone b : blieb bei weiterer Chromatographie einheitlich und verhielt sich wie ein nur an C_{20} reduzierter Metabolit.

Zone c : verhielt sich wie Pregnenolon.

Zone d_1 : konnte aus Mangel an einer geeigneten Vergleichssubstanz nicht charakterisiert

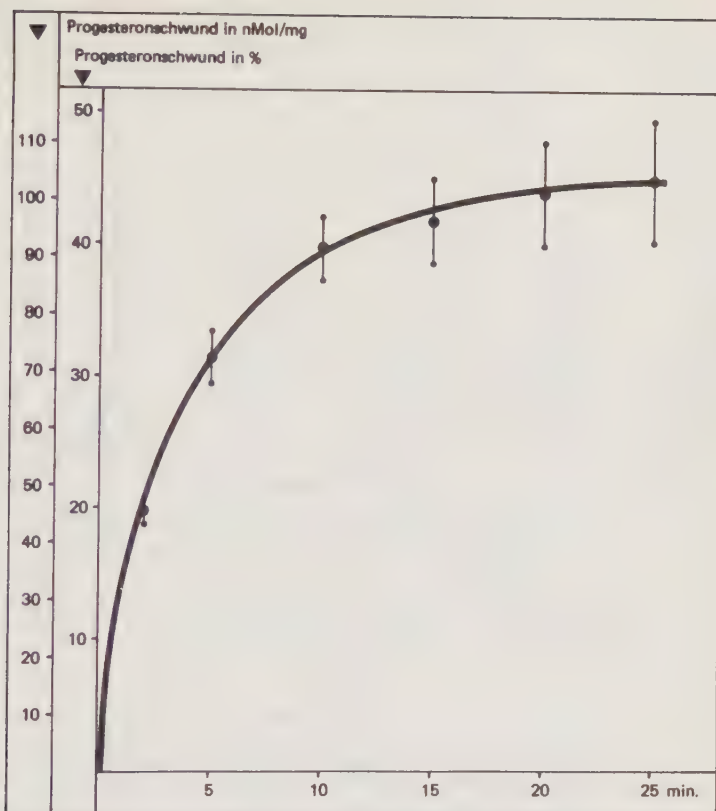


Abb.18: Progesteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen; Substratkonzentration: $200\mu\text{g}/4.32\text{ ml} = 635.98\text{ nMol}/4.32\text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3\text{ mg}/4.32\text{ ml}$, ($n=3$).

werden; aufgrund der Tatsache, daß diese Zone acetylierbar und UV-negativ war, läßt sich aussagen, daß hier ein im Ring A reduzierter Metabolit mit mindestens einer OH-Gruppe vorlag.

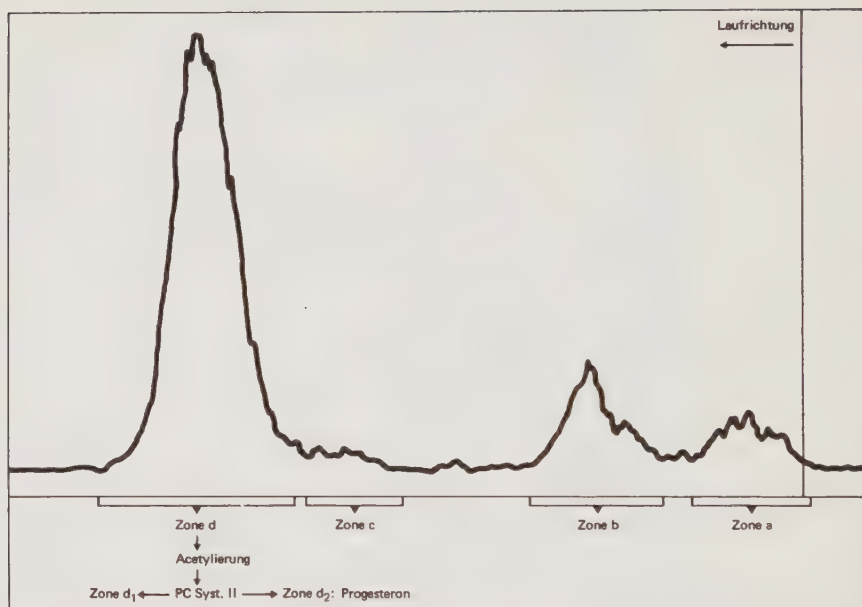


Abb.19: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (25 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst.I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Progesteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen.

In Abbildung 20 (S.56) ist der Schwund des Progesterons und die gleichzeitige Zunahme seiner Metabolite gezeigt; die Angaben wurden als prozentuale Anteile des Progesterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität berechnet.

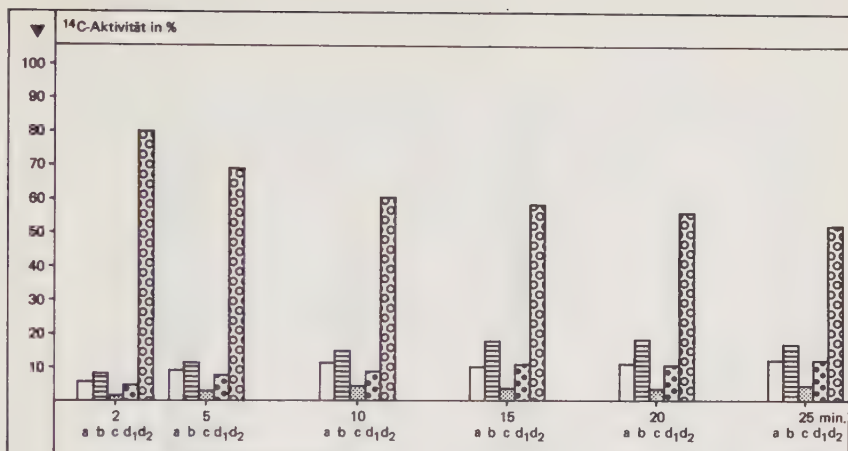


Abb. 20: Prozentualer Anteil des Progesterons (d_2) und seiner Metabolite (a, b, c, d_1) an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von 4- ^{14}C -Progesteron mit dem 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen.

Bei der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des prozentualen Progesteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen ergibt sich ein Progesteronschwund von ca. 95% pro 5 Minuten.

Zur Lokalisation der am Progesteronabbau beteiligten Enzyme in der Zelle der männlichen Kaninchenleber wurden Inkubationen im NADPH-regenerierenden System von 25 Minuten mit dem 10 000Xg-Überstand sowie dem 100 000Xg-Überstand und -Sediment durchgeführt; Progesteronkonzentration: $200\mu\text{g}/4.32\text{ ml} = 635.98\text{ nMol}/4.32\text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3\text{ mg}/4.32\text{ ml}$.

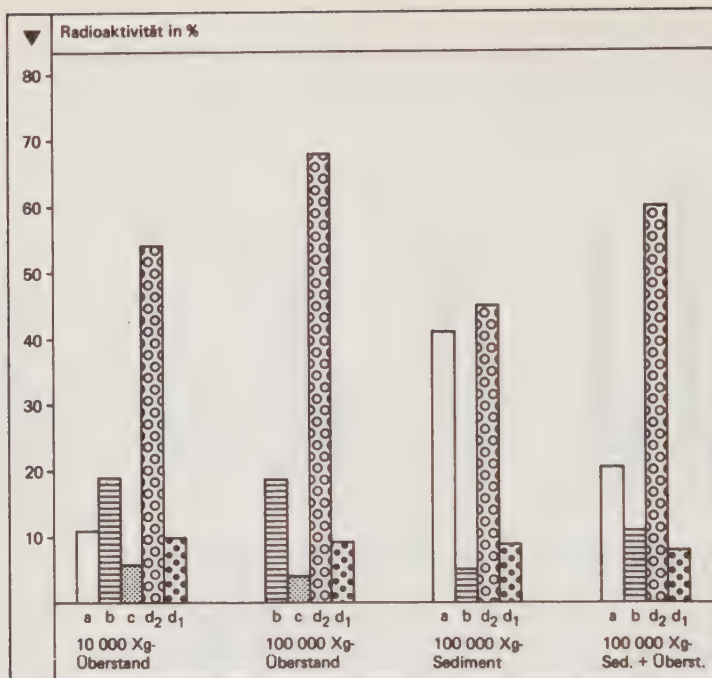


Abb.21: Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität auf Progesteron und seine Metabolite nach Inkubation von 4- ^{14}C -Progesteron mit verschiedenen Zellfraktionen der Leber männlicher Kaninchen. Inkubationsdauer: 25 Min.
a, b, c, d₁: Metabolite des Progesterons,
d₂: Progesteron.

Nach Abbildung 21 ist der Progesteronumsatz in der Mikrosomenfraktion der Leber männlicher Kaninchen um ca. 10-20% größer als in den übrigen Fraktionen.

4.1.8. Untersuchungen zum Progesteronstoffwechsel mit dem Lebergewebe weiblicher Kaninchen

Die Abbildung 22 zeigt den Progesteronumsatz im 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Progesterons bzw. in nMol/mg Leberprotein; Progesteronkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 635.98 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml.

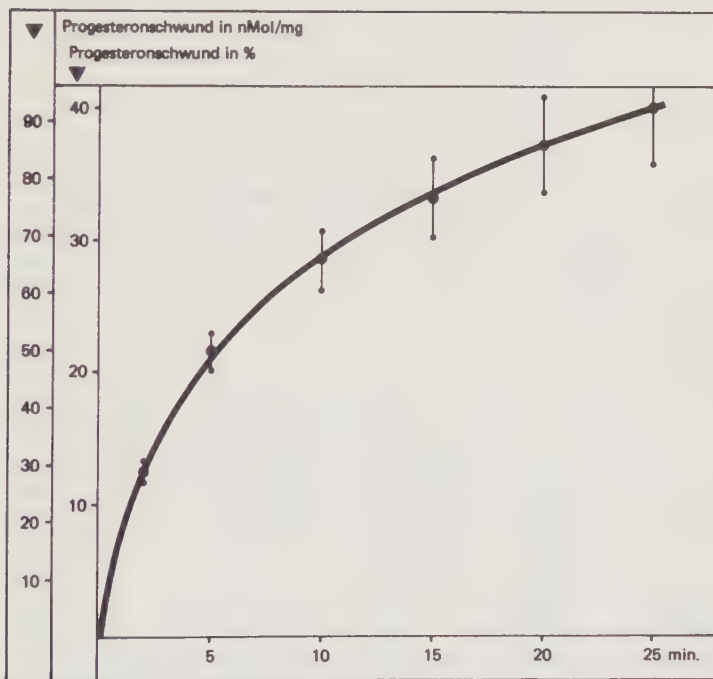


Abb.22: Progesteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen; Substratkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 635.98 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml, (n=3).

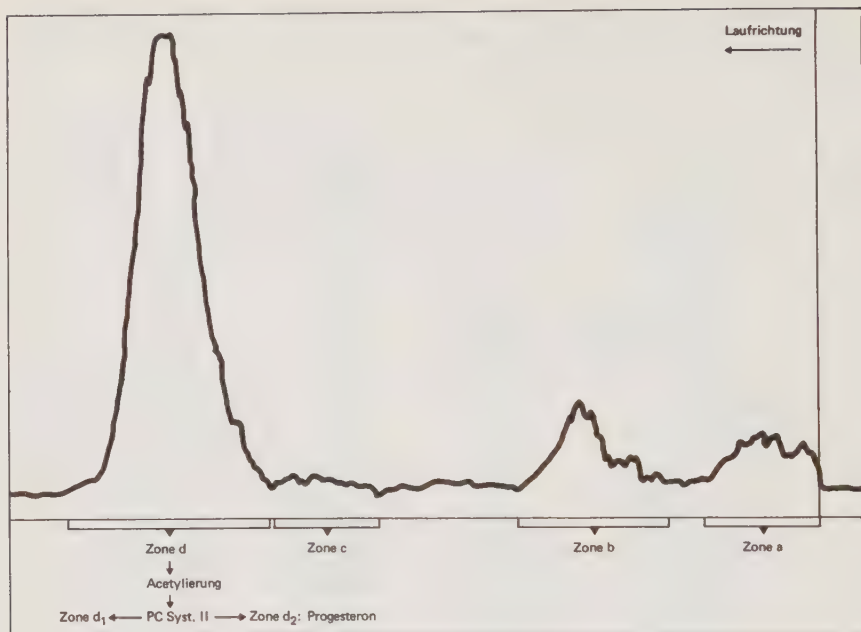


Abb.23: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (25 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst.I und die weitere Auftrennung zur Bestimmung des Progesteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand aus der Leber weiblicher Kaninchen.

Das Scannerdiagramm in Abbildung 23 zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium nach Inkubation von 25 Minuten. Die Substanz d₂ wurde als unverändertes Progesteron identifiziert. Da nur sehr geringe Mengen an Metaboliten gewonnen werden konnten, konnten nur grobe Charakterisierungen vorgenommen werden (Hierzu siehe "Methoden", S.23):

Zone a : bestand aus vier Substanzen, die sich chromatographisch wie vollständig reduzierte Pregnan-diole verhielten.

Zone b : blieb bei weiteren chromatographischen Vergleichen einheitlich und verhielt sich wie ein an C_{20} reduzierter Metabolit.

Zone c : verhielt sich wie Pregnenolon.

Zone d_1 : konnte aus Mangel an einer geeigneten Vergleichssubstanz nicht charakterisiert werden; aufgrund der Tatsache, daß diese Zone acetylierbar und UV-negativ war, läßt sich aussagen, daß hier ein im Ring A reduzierter Metabolit mit mindestens einer OH-Gruppe vorlag.

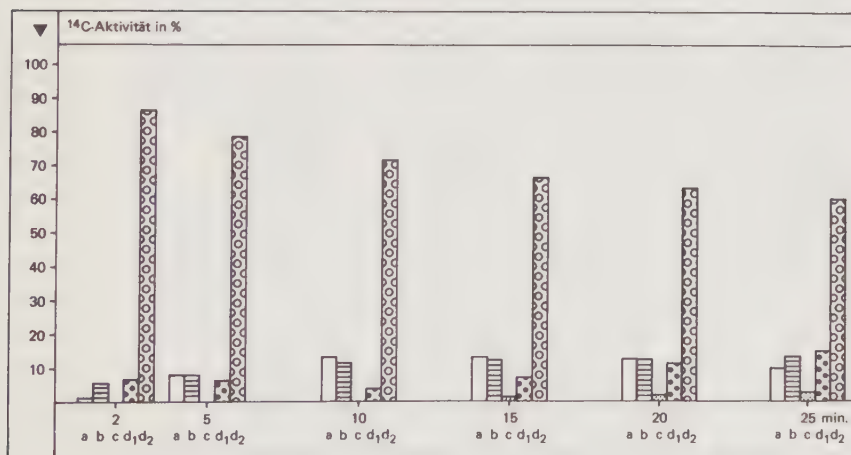


Abb.24: Prozentualer Anteil des Progesterons (d_2) und seiner Metabolite (a, b, c, d_1) an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt- ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von 4- ^{14}C -Progesteron mit dem 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen.

In der Abbildung 24 (S.60) ist der Schwund des Progesterons und die gleichzeitige Zunahme seiner Metabolite gezeigt; die Angaben wurden als prozentuale Anteile des Progesterons und seiner Metabolite an der aus den Inkubationsansätzen extrahierten Gesamt-¹⁴C-Aktivität berechnet.

Aus der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des prozentualen Progesteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber weiblicher Kaninchen ergibt sich ein Progesteronschwund von ca. 66% pro 5 Minuten.

Zur Lokalisation der am Progesteronabbau beteiligten Enzyme in der Zelle der weiblichen Kaninchenleber wurden Inkubationen im NADPH-regenerierenden System von 25 Minuten mit 10 000Xg-Überstand sowie dem 100 000Xg-Überstand und -Sediment durchgeführt; Progesteronkonzentration: $200 \mu\text{g}/4.32 \text{ ml} = 635.98 \text{ nMol}/4.32 \text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3 \text{ mg}/4.32 \text{ ml}$.

Nach Abb. 25 (S.62) ist die Enzymaktivität in der Mikrosomenfraktion der Leber weiblicher Kaninchen geringfügig höher als in den übrigen Fraktionen.

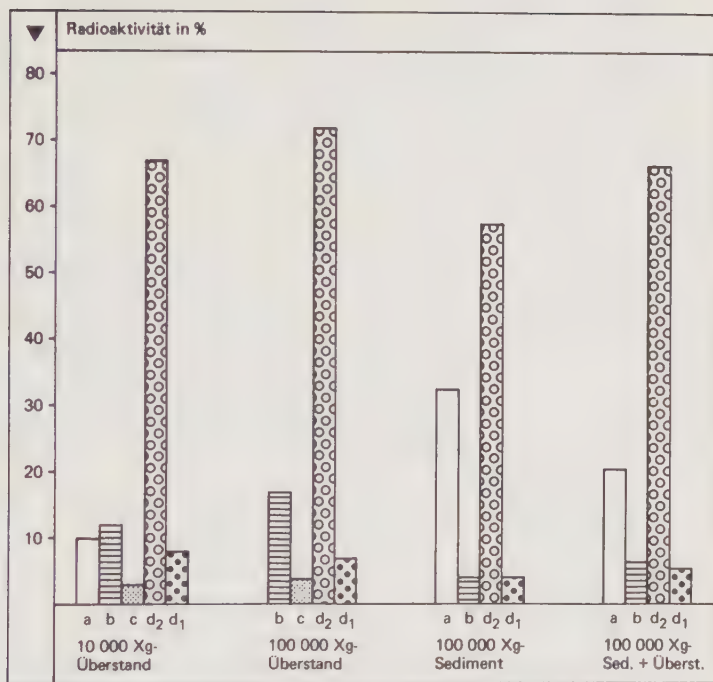


Abb.25: Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität auf Progesteron und seine Metabolite nach Inkubation von 4- ^{14}C -Progesteron mit verschiedenen Zellfraktionen der Leber weiblicher Kaninchen. Inkubationsdauer: 25 Minuten
a, b, c, d₁: Metabolite des Progesterons
d₂: Progesteron.

4.1.9. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Testosteron- und Progesteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber von Ratte, Maus, Hamster und Kaninchen

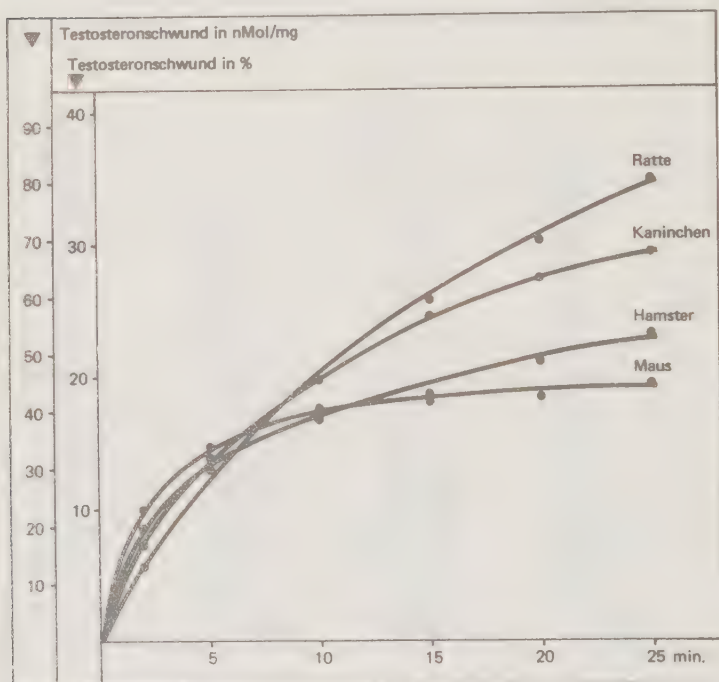


Abb.26: Testosteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Ratten, Mäuse, Hamster und Kaninchen. Substratkonzentration: 200 μ g/4.32 ml = 693.4 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml.

Aus den in Abbildung 26 zusammenfassend dargestellten Versuchsergebnissen folgt, daß der Testosteronschwund über die gesamte Zeit von 25 Minuten in der Reihenfolge Maus, Hamster, Kaninchen und Ratte zunimmt. Wie aus Abbildung 26 ebenfalls hervorgeht, nimmt jedoch die

Anfangsgeschwindigkeit des Testosteronschwundes in umgekehrter Reihenfolge zu.

Die graphische Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des prozentualen Testosteronumsatzes im 10 000Xg-Überstand der Leber der untersuchten Tiere auf 5 Minuten ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tierart (männl.)	Ratte	Kanin- chen	Hamster	Maus
Umsatz pro 5 Min. bei Extrapol. der Initial- geschwindig- keit	16%	23%	34%	48%

Tab.1: Prozentualer Testosteronschwund pro 5 Minuten im 10 000Xg-Überstand der Leber von Ratte, Kaninchen, Hamster und Maus, ermittelt durch graphische Extrapolation der Initialgeschwindigkeit; Substratkonzentration: 200 µg/4.32 ml = 693.4 nMol/4.32 ml, Proteinkonzentration: 3 mg/4.32 ml.

Aus der Abbildung 27 (S.65) folgt, daß Progesteron unabhängig vom Geschlecht der Tiere im 10 000Xg-Überstand der Kaninchenleber schneller abgebaut wird als Testosteron. Unabhängig von diesem substratbedingten Unterschied zeigt die Abbildung 27, daß das Lebergewebe von männlichen Kaninchen sowohl Progesteron als auch Testosteron schneller metabolisiert als das Lebergewebe weiblicher Tiere.

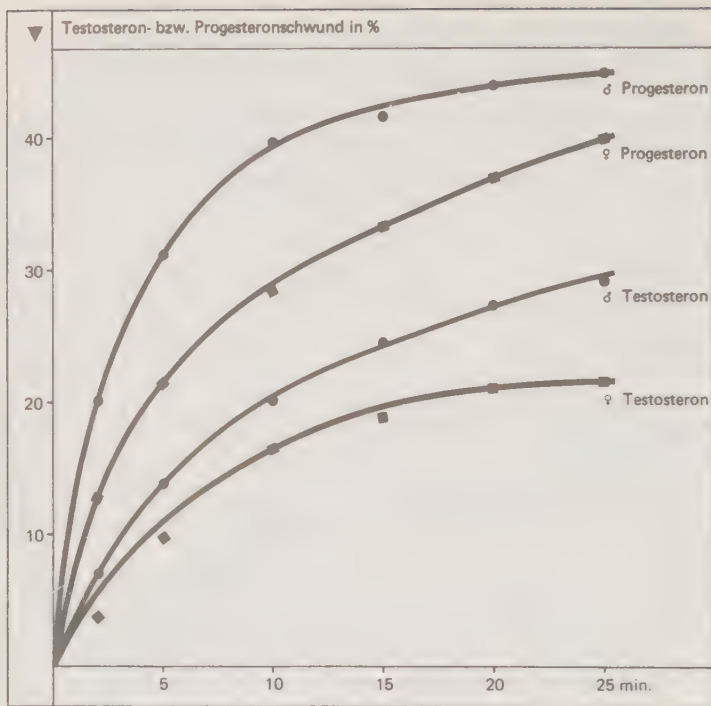


Abb.27: Testosteron- bzw. Progesteronschwund im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher und weiblicher Kaninchen; Substratkonzentration: Testosteron: $200 \mu\text{g}/4.32 \text{ ml} = 693.4 \text{ nMol}/4.32 \text{ ml}$, Progesteron: $200 \mu\text{g}/4.32 \text{ ml} = 635.98 \text{ nMol}/4.32 \text{ ml}$, Proteinkonzentration: $3 \text{ mg}/4.32 \text{ ml}$.

In der Tabelle 2 sind die prozentualen Testosteron- bzw. Progesteronumsätze im 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher und weiblicher Kaninchen angegeben; die Werte wurden durch graphische Extrapolation der Initialgeschwindigkeit auf 5 Minuten ermittelt.

	Substrat	Kaninchen männl.	Kaninchen weibl.
Umsatz pro 5 Min. bei Extrapol. der Initial- geschwindig- keit	Progest.	95%	66%
	Testost.	23%	14%

Tab.2: Prozentualer Testosteron- bzw. Progesteron-
schwund im 10 000Xg-Überstand der Leber
männlicher bzw. weiblicher Kaninchen, er-
mittelt durch graphische Extrapolation der
Initialgeschwindigkeit auf 5 Minuten.

4.2. Testosteronstoffwechsel im Vollhomogenat, dem 24_500Xg-Sediment und -Überstand aus dem Leber- gewebe der Ratte und Maus sowie des Hamsters, Meerschweinchens und Kaninchens mit NADP⁺ bzw. NAD⁺ als Wasserstoffakzeptoren

Die Aktivität der 17 β -OH-Steroiddehydrogenase in der Leber der untersuchten Tiere wurde nach Endahl und Mitarb. (34) bestimmt. Mit der dort beschriebenen Methode wurde mit Testosteron als Substrat die Aktivität der 17 β -OH-Steroiddehydrogenase im Vollhomogenat der Leber sowie dem 24 500Xg-Überstand und -Sediment in Gegenwart von NAD⁺ bzw. NADP⁺ untersucht.

Die einzelnen Zellfraktionen wurden vor der Inkubation nicht auf einen definierten Proteingehalt eingestellt. Durch photometrische Bestimmung wurde nachträglich die zur Inkubation eingesetzte Menge Leberprotein ermittelt. Die eingesetzten Mengen Leberprotein werden jeweils angegeben. Die übrigen Faktoren wurden konstant gehalten und sind aus dem Kapitel "Methoden" (S.19) zu entnehmen.

4.2.1. Untersuchungen mit Lebergewebe der Ratte

Zur Inkubation wurden in 46.5 ml Gesamtvolumen eingesetzt:

Vollhomogenat	: 46.5 mg Leberprotein
24 500Xg-Sediment	: 7.5 mg Leberprotein
24 500Xg-Überstand	: 24.0 mg Leberprotein
Testosteronkonzentration	: 864 μ g/46.5 ml

In den Abbildungen 28 und 29 ist der Testosteronschwund der einzelnen Zellfraktionen der Leber männlicher Ratten in nMol/mg Leberprotein in Gegenwart von NADP⁺ bzw. NAD⁺ wiedergegeben.

Das Scannerdiagramm in Abbildung 30 (S.70) zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium in PC System I und deren weitere Auftrennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes. Die

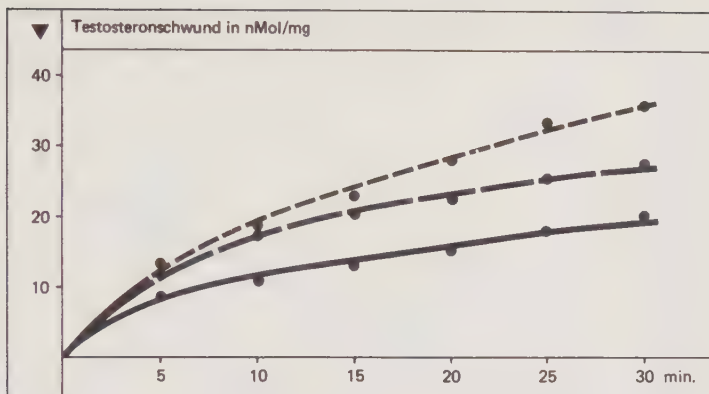


Abb.28: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— — —) und 24 500Xg-Überstand (-----) der Leber männlicher Ratten in Gegenwart von NADP^+ . Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=2).

Inkubation wurde mit dem Vollhomogenat der Leber von zwei männlichen Ratten in Gegenwart von NADP^+ durchgeführt; die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten. Die Zone a wurde als nicht umgesetztes Testosteron und die Zone b als 4-Androstendion identifiziert.

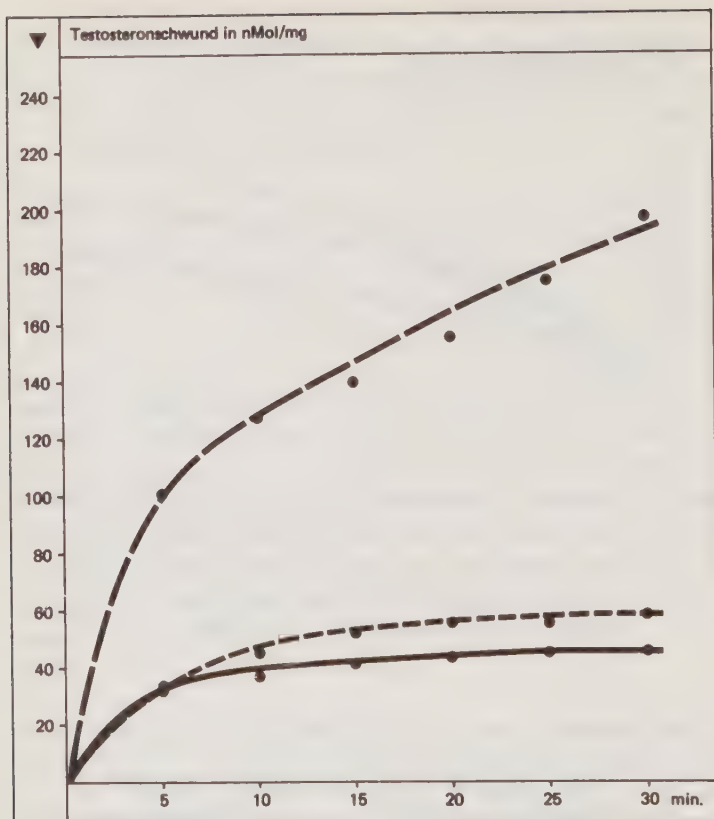


Abb.29: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— — —) und 24 500Xg-Überstand (----) der Leber männlicher Ratten in Gegenwart von NAD^+ . Substratkonzentration: $18.6 \mu\text{g/ml}$, ($n=2$).

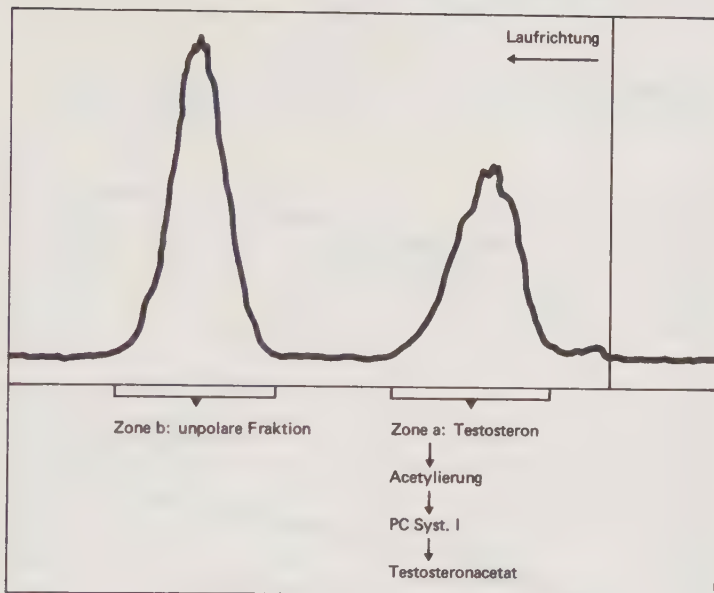


Abb.30: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (10 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst.I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes im Vollhomogenat der Leber der männlichen Ratte in Gegenwart von NADP^+ .

In den Abbildungen 31a-c ist der Testosteronschwund in Gegenwart von NADP^+ bzw. NAD^+ im Vollhomogenat sowie im 24 500Xg-Sediment und -Überstand der Leber männlicher Ratten in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons dargestellt.

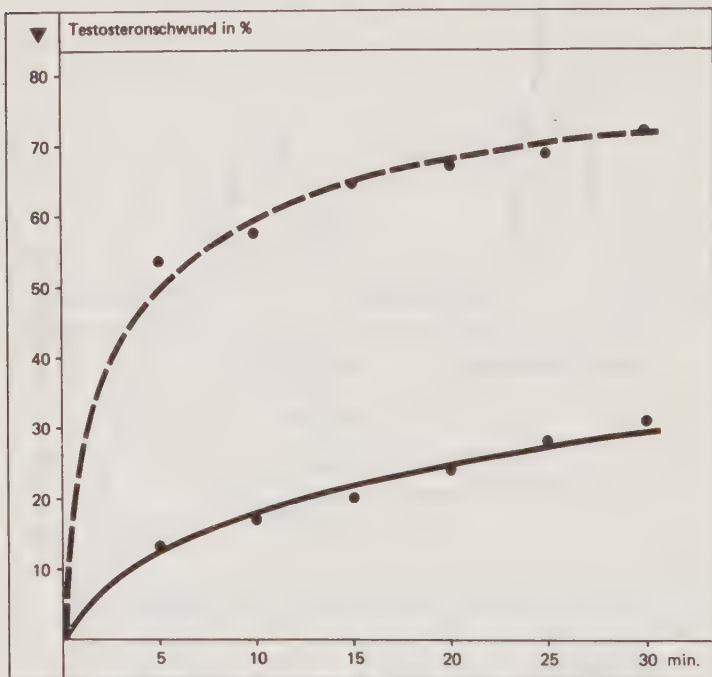


Abb.31a: Prozentualer Testosteronschwund im Vollhomogenat der Leber männlicher Ratten bei einem Einsatz von 46.5 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (----) Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=2).

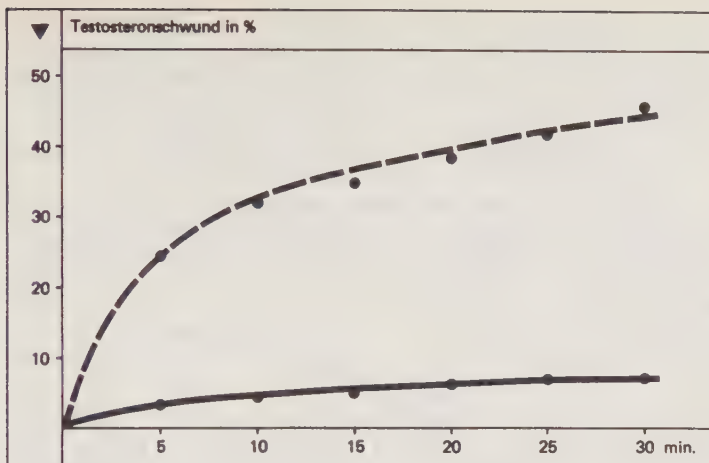


Abb.31b: Legende siehe unten.

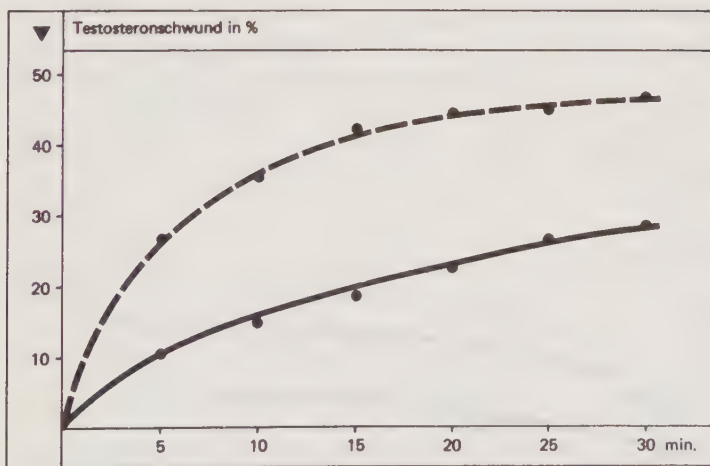


Abb.31c: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Überstand (und 24 500Xg-Sediment, Abb.31b) der Leber männlicher Ratten bei einem Einsatz von 24.0 mg (7.5 mg, Abb.31b) Leberprotein in Gegenwart von NADP⁺ (—) bzw. NAD⁺ (----)
Substratkonzentration: 18.6 μ g/ml, (n=2).

4.2.2. Untersuchungen mit Lebergewebe der Maus

Zur Inkubation wurden in 46.5 ml Gesamtvolumen eingesetzt:
 Vollhomogenat : 14.7 mg Leberprotein
 24 500Xg-Sediment : 4.0 mg Leberprotein
 24 500Xg-Überstand: 2.7 mg Leberprotein
 Testosteronkonzentration: 864 μ g/46.5 ml

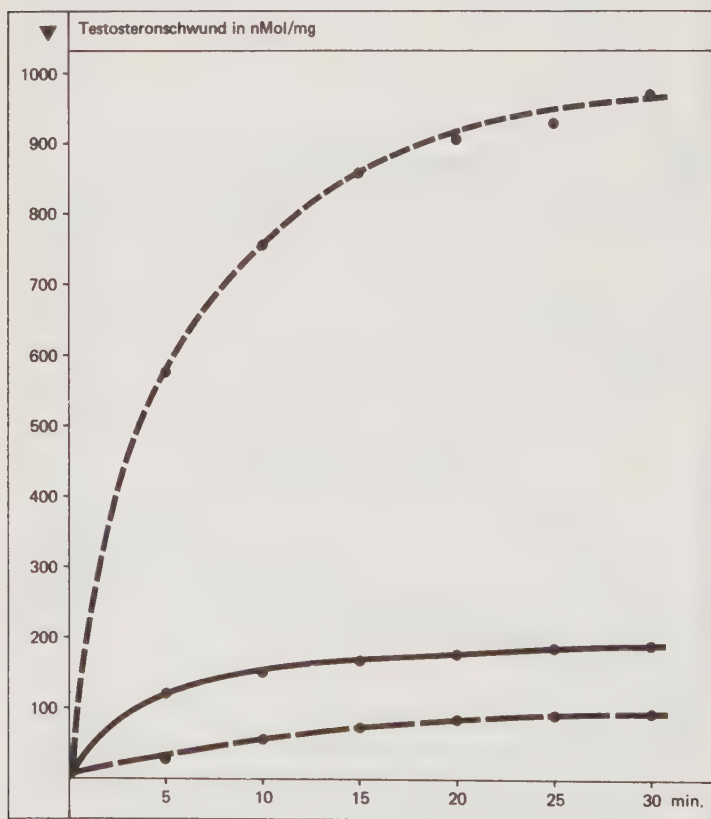


Abb.32: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— — —) und 24 500Xg-Überstand (---) der Leber männlicher Mäuse in Gegenwart von NADP⁺; Substratkonzentration: 18.6 μ g/ml, (n=9).

In den Abbildungen 32 und 33 ist der Testosteronschwund der einzelnen Zellfraktionen aus der Leber männlicher Mäuse in nMol/mg Leberprotein in Gegenwart von NADP⁺ bzw. NAD⁺ wiedergegeben; die Kurven stellen den Mittelwert von neun Tieren dar.

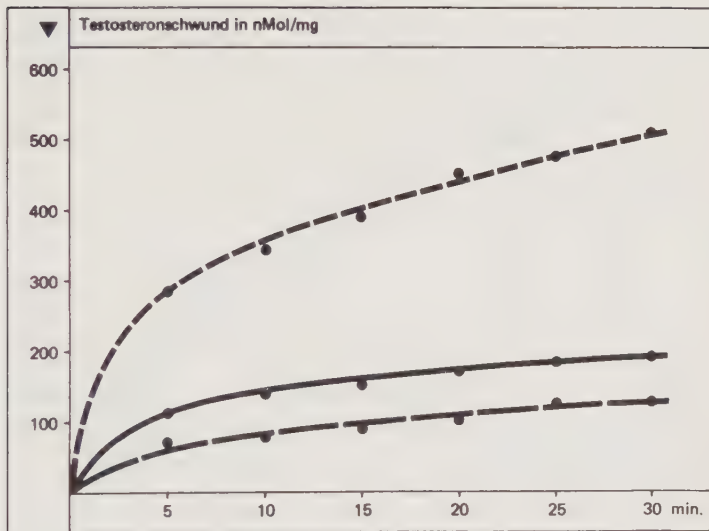


Abb.33: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— —) und 24 500Xg-Überstand (----) der Leber männlicher Mäuse in Gegenwart von NAD⁺; Substratkonzentration: 18.6 µg/ml, (n=9).

Das Scannerdiagramm in Abbildung 34 (S.75) zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium in PC System I und deren weitere Auftrennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes. Die Inkubation wurde mit dem Vollhomogenat der Leber

von neun männlichen Mäusen in Gegenwart von NADP^+ durchgeführt; die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten; die Zone a wurde als nicht umgesetztes Testosteron und die Zone b als 4-Androstendion identifiziert.

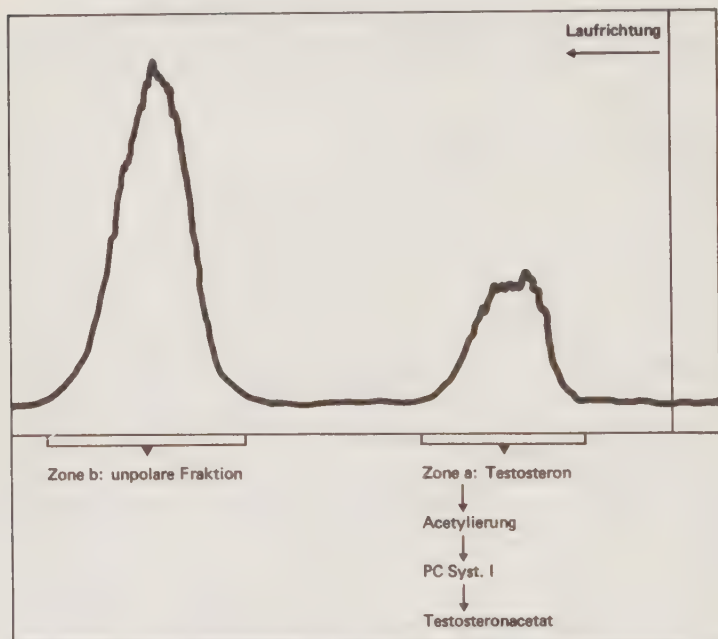


Abb.34: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (10 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst. I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes im Vollhomogenat der Leber männlicher Mäuse in Gegenwart von NADP^+ .

In den Abbildungen 35a-c ist der Testosteronschwund in Gegenwart von NADP^+ bzw. NAD^+ im Vollhomogenat sowie im 24 500Xg-Sediment und -Überstand der Leber männlicher Mäuse in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons dargestellt.

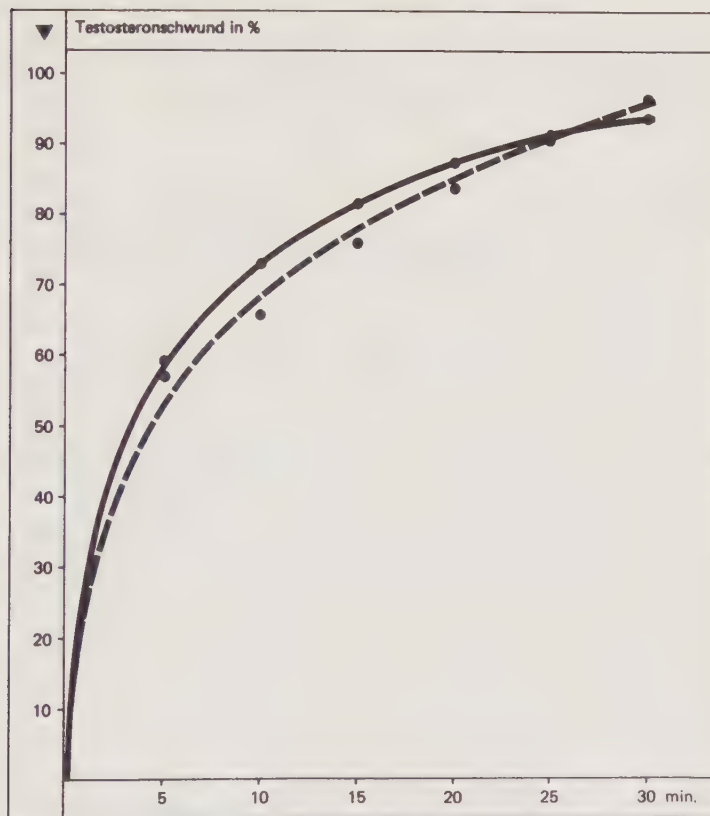


Abb. 35a: Prozentualer Testosteronschwund im Vollhomogenat der Leber männlicher Mäuse bei einem Einsatz von 14.7 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (---), Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=9).

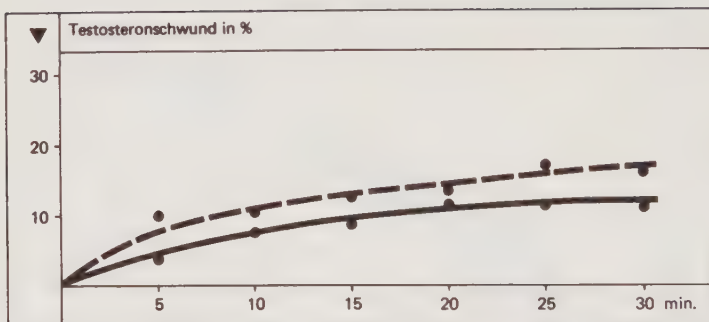


Abb.35b: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Sediment der Leber männlicher Mäuse bei einem Einsatz von 4.0 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (---), Substratkonzentration: $18.6 \mu\text{g/ml}$, ($n=9$).

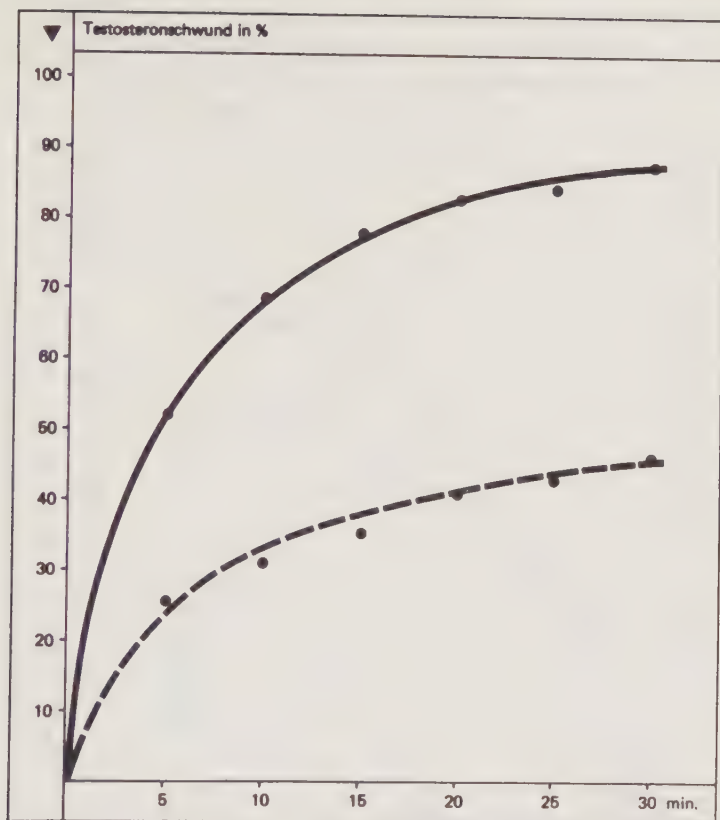


Abb.35c: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Überstand der Leber männlicher Mäuse bei einem Einsatz von 2.7 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (---), Substratkonzentration: $18.6 \mu\text{g/ml}$, ($n=9$).

4.2.3. Untersuchungen mit Lebergewebe des Streifenhamsters

Zur Inkubation wurden in 46.5 ml Gesamtvolumen einge-

setzt: Vollhomogenat : 14.6 mg Leberprotein

24 500Xg-Sediment : 9.8 mg Leberprotein

24 500Xg-Überstand: 11.6 mg Leberprotein

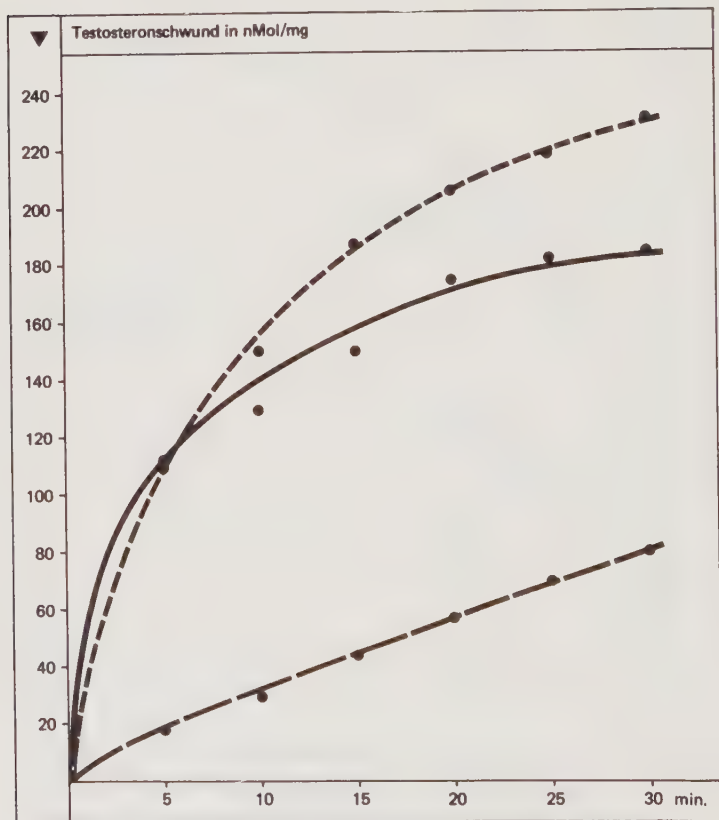


Abb.36: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (---) und 24 500Xg-Überstand (····) der Leber männlicher Steifenhamster in Gegenwart von NADP^+ , Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=5).

In den Abbildungen 36 und 37 ist der Testosteronschwund der einzelnen Zellfraktionen aus der Leber männlicher Streifenhamster in nMol/mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ bzw. NAD^+ wiedergegeben.

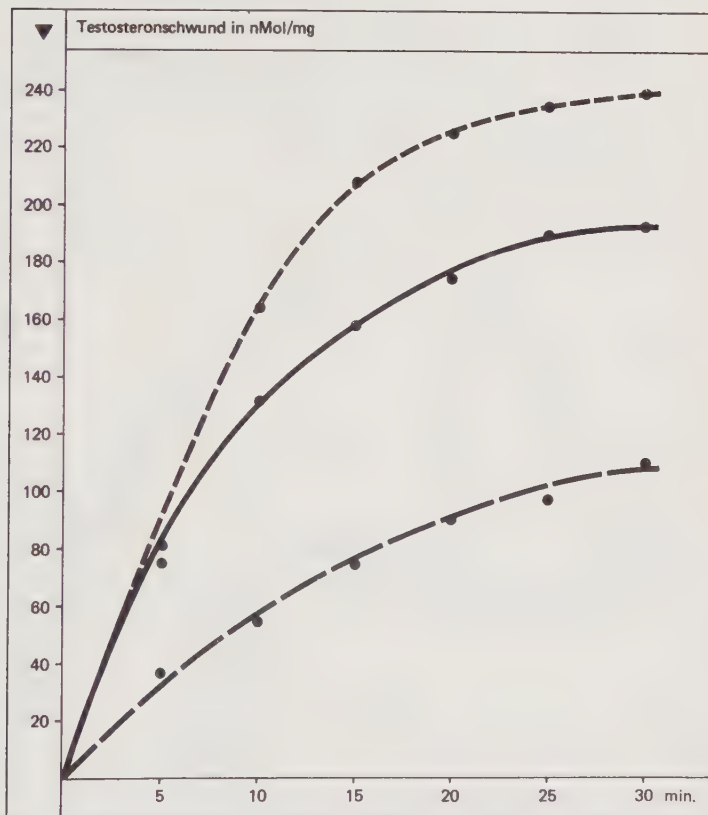


Abb.37: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— — —) und 24 500Xg-Überstand (- - - -) der Leber männlicher Streifenhamster in Gegenwart von NAD^+ , Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=5).

Das Scannerdiagramm in Abbildung 38 zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium in PC System I und deren weitere Auftrennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes. Die Inkubation wurde mit dem Vollhomogenat der Leber von fünf männlichen Streifenhamstern in Gegenwart von NADP^+ durchgeführt; die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten. Die Zone a wurde als nicht metabolisiertes Testosteron und die Zone b als 4-Androstendion identifiziert.

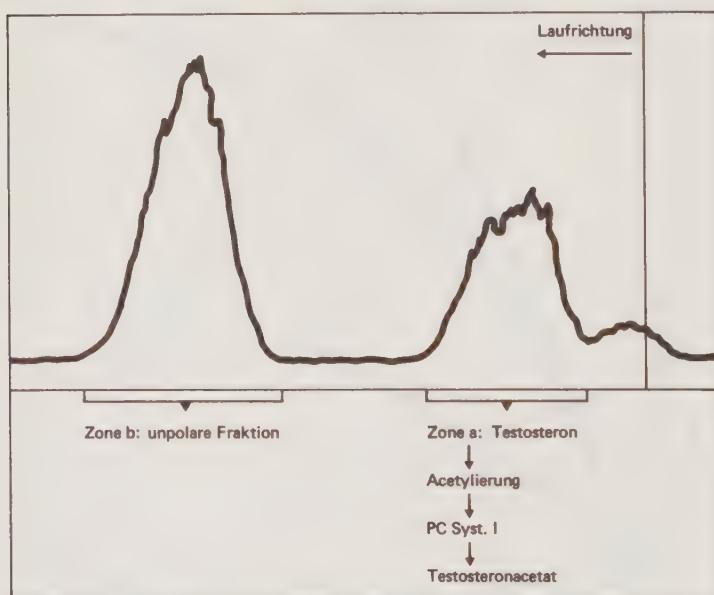


Abb.38: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (10 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst.I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes im Vollhomogenat der Leber männlicher Streifenhamster in Gegenwart von NADP^+ .

In den Abbildungen 39a-c ist der Testosteronschwund in Gegenwart von NAD^+ bzw. NADP^+ im Vollhomogenat sowie im 24 500Xg-Sediment und -Überstand der Leber männlicher Streifenhamster in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons dargestellt.

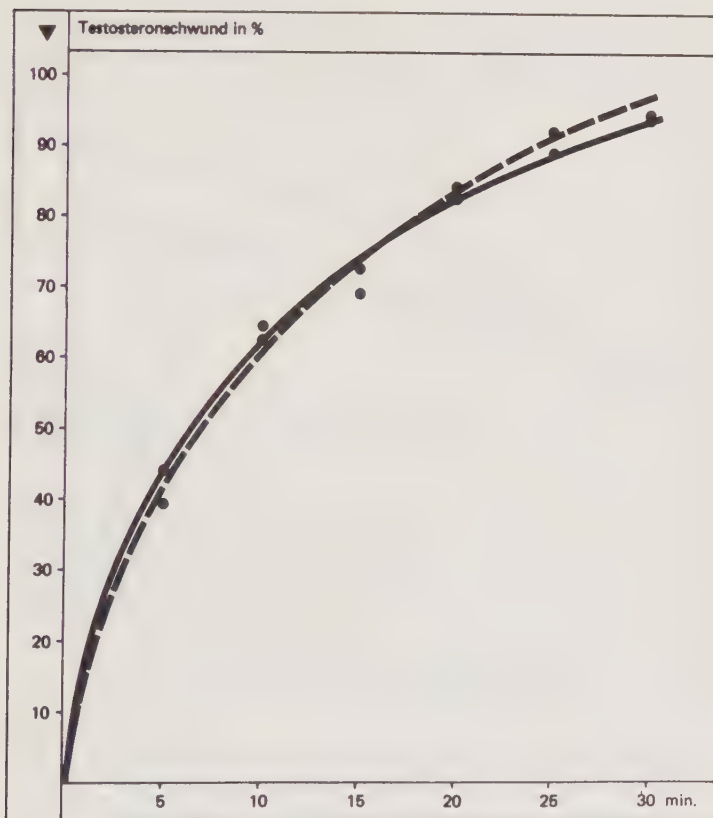


Abb.39a: Prozentualer Testosteronschwund im Vollhomogenat der Leber männlicher Streifenhamster bei einem Einsatz von 14.6 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (----), Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=5).

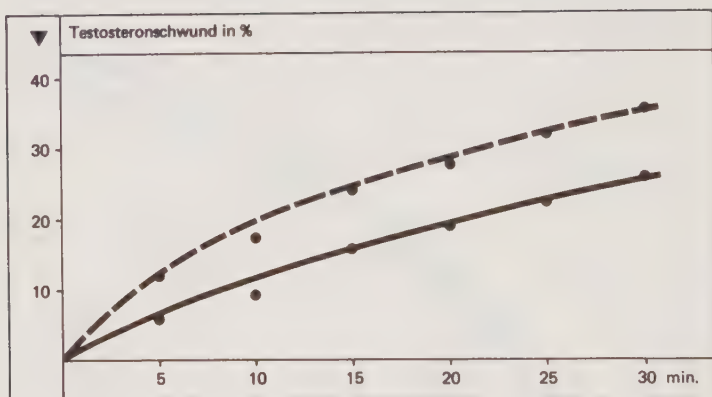


Abb. 39b: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Sediment der Leber männlicher Streifenhamster bei einem Einsatz von 9.8 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (----), Substratkonzentration: $18.6 \mu\text{g/ml}$, ($n=5$).

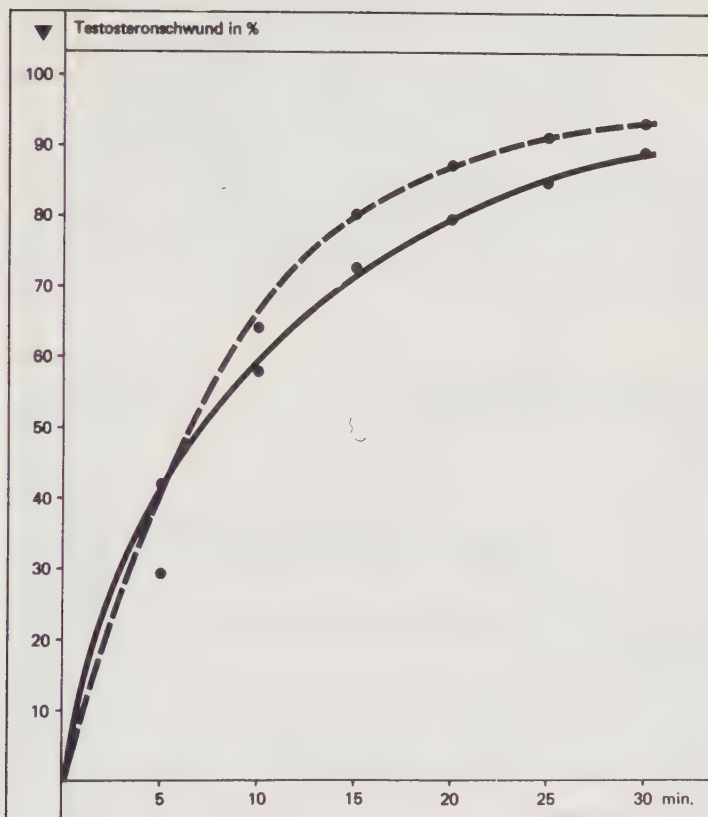


Abb. 39c: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Überstand der Leber männlicher Streifenhamster bei einem Einsatz von 11.6 mg Leberprotein in Gegenwart von NAD⁺ (—) bzw. NAD⁺ (---), Substratkonzentration: 18.6 µg/ml, (n=5).

4.2.4. Untersuchungen mit Lebergewebe des Meerschweinchens

Zur Inkubation wurden in 46.5 ml Gesamtvolumen eingesetzt: Vollhomogenat : 21.7 mg Leberprotein

24 500Xg-Sediment : 3.0 mg Leberprotein

24 500Xg-Überstand: 10.5 mg Leberprotein

Testosteronkonzentration: 864 μ g/46.5 ml

In den Abbildungen 40 und 41 ist der Testosteronschwund der einzelnen Zellfraktionen der Leber männlicher Meerschweinchen in nMol/mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ bzw. NAD^+ wiedergegeben.

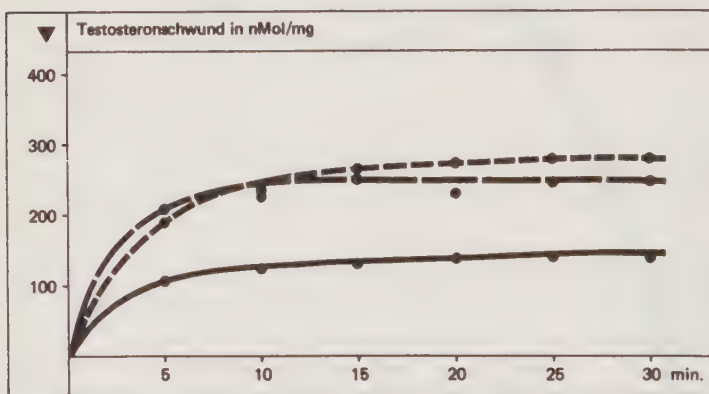


Abb.40: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— —) und 24 500Xg-Überstand (---) der Leber männlicher Meerschweinchen in Gegenwart von NADP^+ , Substratkonzentration: 18.6 μ g/ml, (n=2).

In den Abbildungen 43a-c ist der Testosteronschwund in Gegenwart von NAD^+ bzw. NADP^+ im Vollhomogenat sowie im 24 500Xg-Sediment und -Überstand der Leber männlicher Meerschweinchen in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons dargestellt.

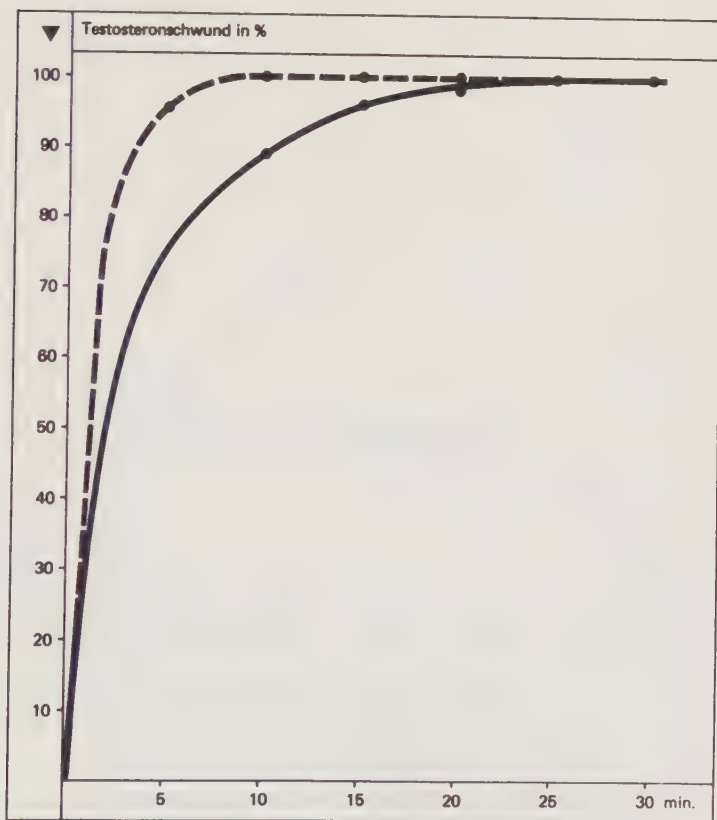


Abb.43a: Prozentualer Testosteronschwund im Vollhomogenat der Leber männlicher Meerschweinchen bei einem Einsatz von 21.7 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (---), Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=2).

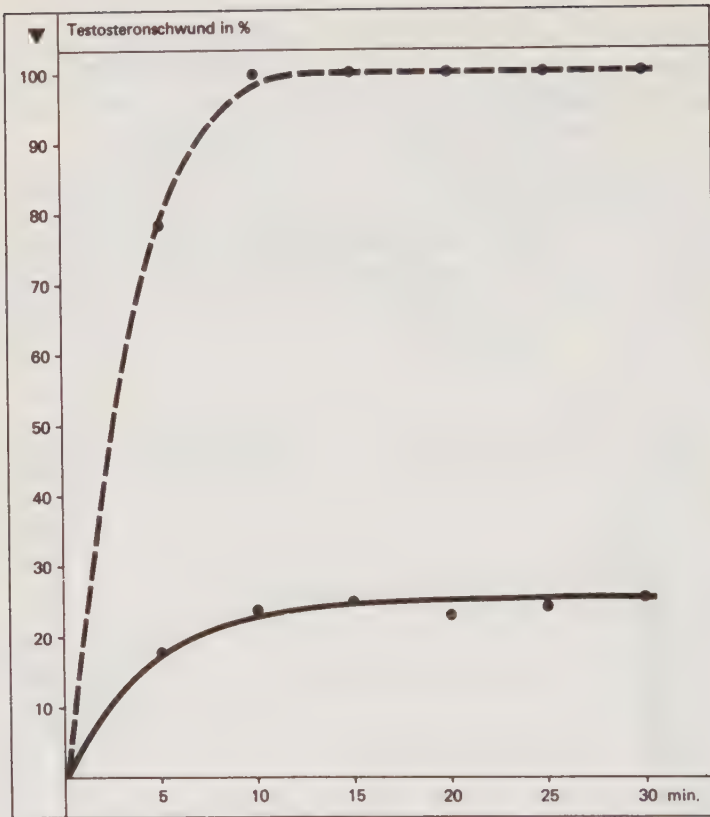


Abb.43b: Testosteronschwund im 24 500Xg-Sediment der Leber männlicher Meerschweinchen bei einem Einsatz von 3.0 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP⁺ (—) bzw. NAD⁺ (----), Substratkonzentration: 18.6 μ g/ml, (n=2).

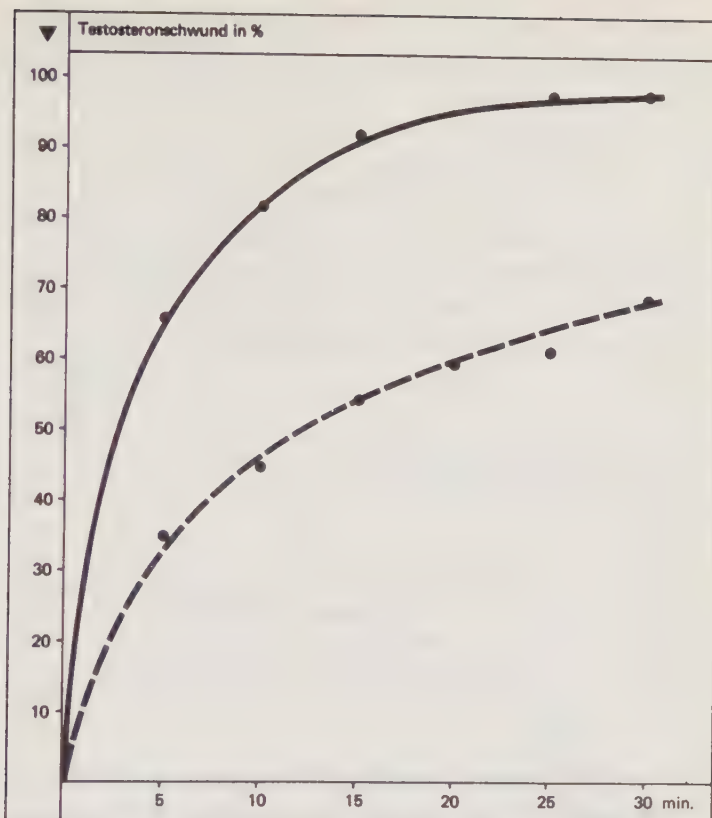


Abb.43c: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Überstand der Leber männlicher Meerschweinchen bei einem Einsatz von 10.5 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (---), Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g/ml}$, (n=2).

4.2.5. Untersuchungen mit Lebergewebe des Kaninchens

Zur Inkubation wurden in 46.5 ml Gesamtvolumen einge-

setzt: Vollhomogenat : 21.7 mg Leberprotein

24 500Xg-Sediment : 3.0 mg Leberprotein

24 500Xg-Überstand: 11.7 mg Leberprotein

Testosteronkonzentration: 864 $\mu\text{g}/46.5 \text{ ml}$

In den Abbildungen 44 und 45 ist der Testosteron-
schwund der einzelnen Zellfraktionen aus der Leber
männlicher Kaninchen in nMol/mg Leberprotein in Ge-
genwart von NADP^+ bzw. NAD^+ wiedergegeben.

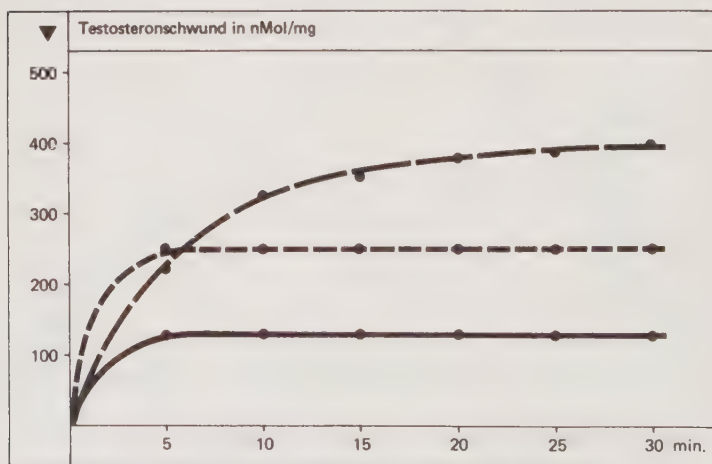


Abb.44: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Voll-
homogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— —) und 24 500Xg-Überstand (----) der Leber männ-
licher Kaninchen in Gegenwart von NADP^+ ,
Substratkonzentration: 18.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (n=2).

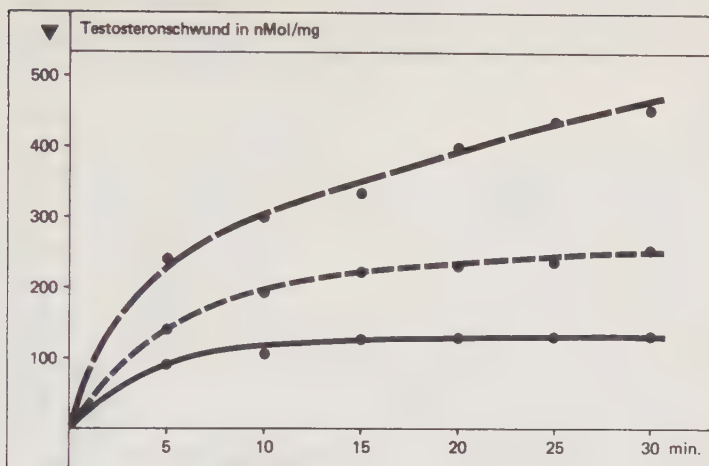


Abb.45: Testosteronschwund (nMol/mg Protein) im Vollhomogenat (—), 24 500Xg-Sediment (— —) und 24 500Xg-Überstand (---) der Leber männlicher Kaninchen in Gegenwart von NAD^+ , Substratkonzentration: $18.6 \mu\text{g/ml}$, ($n=2$).

Das Scannerdiagramm in Abbildung 46 zeigt als Beispiel die Aktivitätsverteilung nach chromatographischer Auftrennung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium in PC System I und deren weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes. Die Inkubation wurde mit dem Vollhomogenat der Leber von zwei männlichen Kaninchen in Gegenwart von NADP^+ durchgeführt; die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten. Die Zone a wurde als nicht metabolisiertes Testosteron und die Zone b als 4-Androstendion identifiziert.

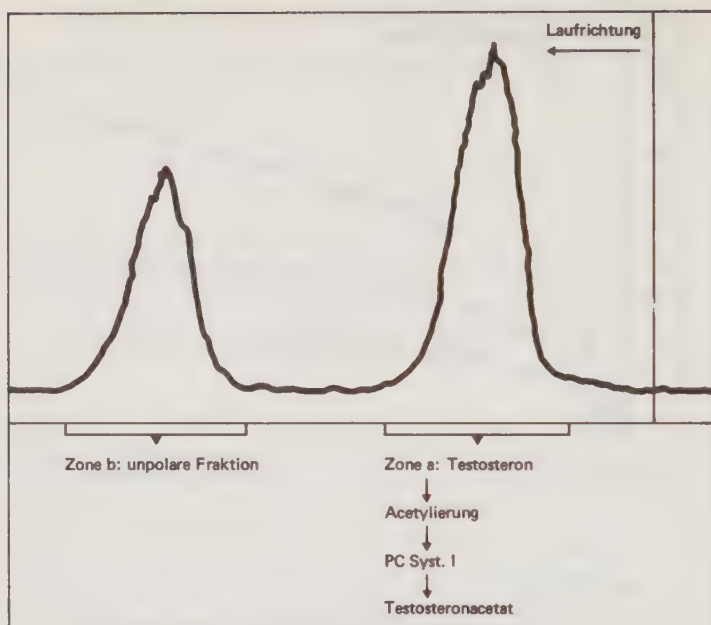


Abb.46: Verteilung der radioaktiven Verbindungen im Inkubationsmedium (10 Min.) nach chromatographischer Auftrennung in PC Syst. I und die weitere Trennung zur Bestimmung des Testosteronschwundes im Vollhomogenat der Leber männlicher Kaninchen in Gegenwart von NADP^+ .

In den Abbildungen 47a-c ist der Testosteronschwund in Gegenwart von NADP^+ bzw. NAD^+ im Vollhomogenat sowie im 24 500Xg-Sediment und -Überstand der Leber männlicher Kaninchen in Prozent des zur Inkubation eingesetzten Testosterons dargestellt.

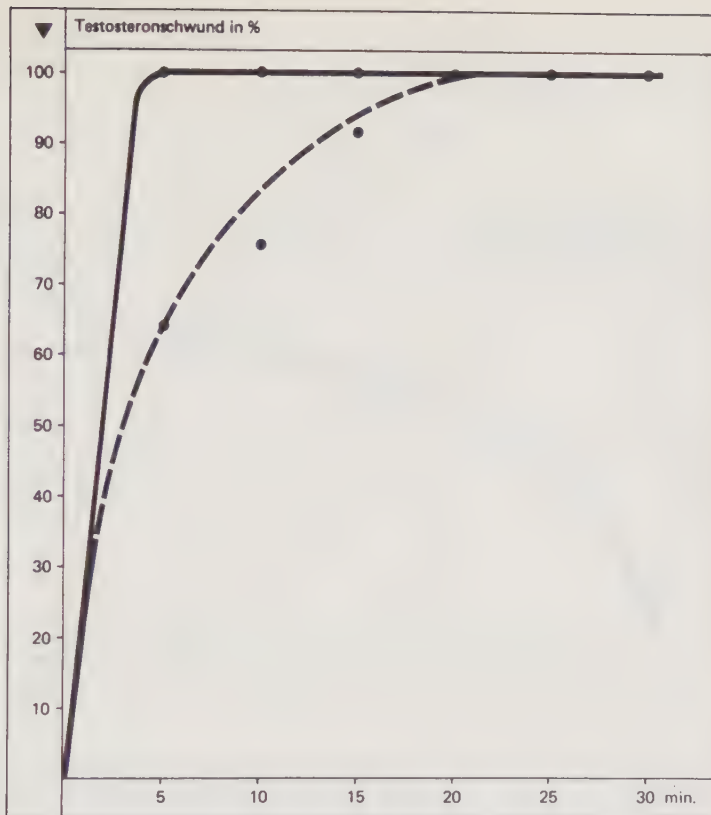


Abb.47a: Prozentualer Testosteronschwund im Vollhomogenat der Leber männlicher Kaninchen bei einem Einsatz von 21.7 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP⁺ (—) bzw. NAD⁺ (----), Substratkonzentration: 18.6 µg/ml, (n=2).

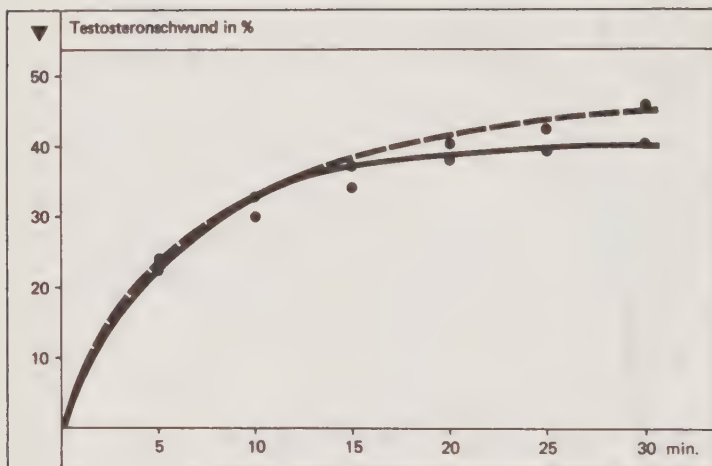


Abb.47b: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Sediment der Leber männlicher Kaninchen bei einem Einsatz von 3.0 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP^+ (—) bzw. NAD^+ (---), Substratkonzentration: $18.6 \mu\text{g/ml}$, ($n=2$).

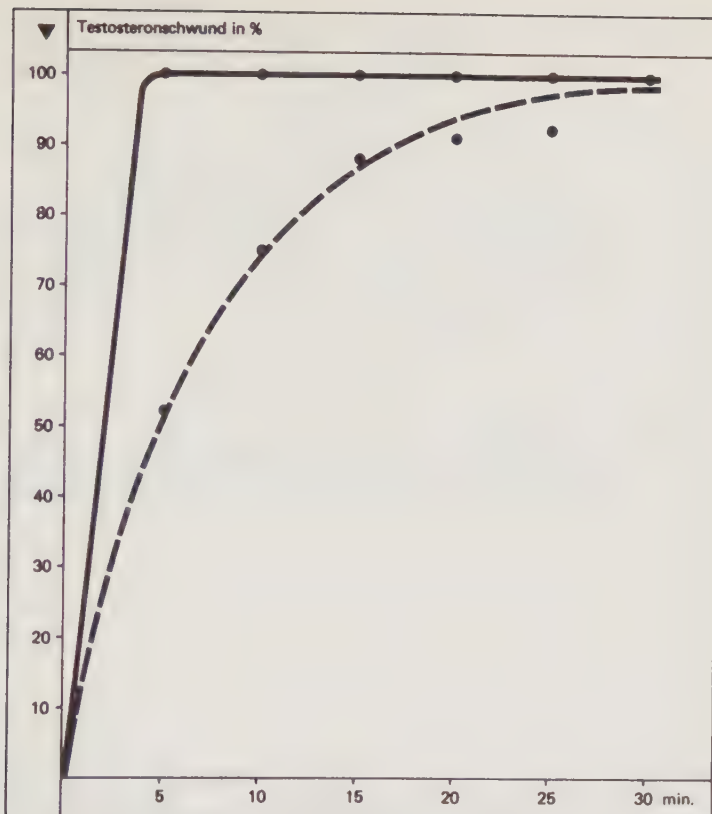


Abb.47c: Prozentualer Testosteronschwund im 24 500Xg-Überstand der Leber männlicher Kaninchen bei einem Einsatz von 11.7 mg Leberprotein in Gegenwart von NADP⁺ (—) bzw. NAD⁺ (---), Substratkonzentration: 18.6 μ g/ml, (n=2).

4.2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Testosteron- schwund im Vollhomogenat, dem 24 500Xg-Überstand und -Sediment der Leber von Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen

Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Werte zeigen die durch graphische Extrapolation der Initialgeschwindigkeit der Testosteron an C_{17} oxydierenden Reaktion erhaltenen Ergebnisse; die Angaben sind als Näherungswerte zu verstehen und in nMol Testosteron pro mg Leberprotein in 5 Minuten dargestellt.

	NADP ⁺			NAD ⁺		
	Homo- genat	24 500Xg- Sediment	24 500Xg- Überstand	Homo- genat	24 500Xg- Sediment	24 500Xg- Überstand
Ratte	10	20	20	100	170	50
Maus	240	40	880	180	90	620
Hamster	160	20	140	100	45	85
Meer- schw.	200	450	310	300	780	140
Kanin- chen	300	300	1350	90	340	150

Tab.3: Testosteronschwund in nMol/mg Leberprotein pro 5 Minuten im Vollhomogenat, 24 500Xg-Sediment und -Überstand der Leber von Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen in Gegenwart von NADP⁺ bzw. NAD⁺.

4.3. Testosteronstoffwechsel in vivo nach intraperitonealer Injektion beim Meerschweinchen

4.3.1. Bilanz der Wiederfindung der injizierten ^{14}C -Aktivität

Nach Abbildung 48 scheiden männliche und weibliche Meerschweinchen in 197 Stunden ca. 50-60% des injizierten $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Testosterons über Harn und Stuhl aus.

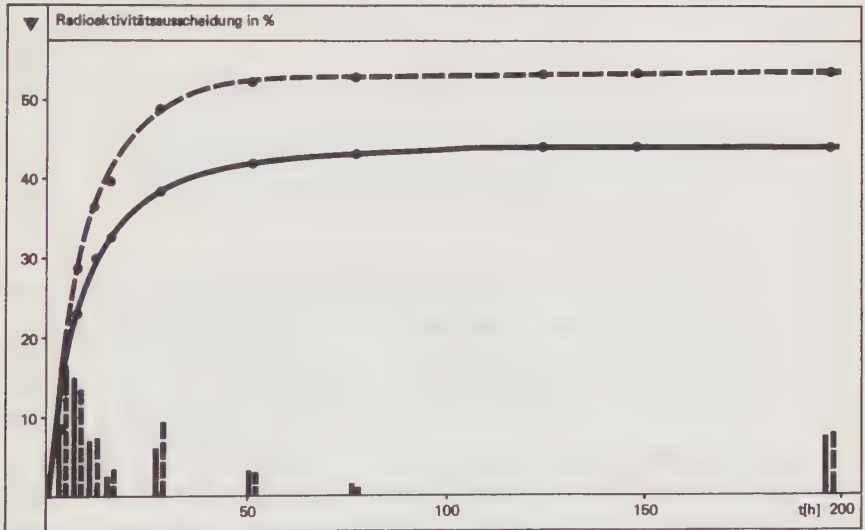


Abb.48: Ausscheidung der ^{14}C -Aktivität über den Harn bei männlichen (—) und weiblichen (---) Meerschweinchen nach intraperitonealer Injektion von $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Testosteron in Prozent der injizierten Aktivität; bei 197 Stunden ist für beide Geschlechter additiv die Ausscheidung über den Stuhl angegeben; injizierte Menge: $0,1\text{ mg } 4\text{-}^{14}\text{C}$ -Testosteron, (n=4).

Bei der Untersuchung der Atemluft wurde festgestellt, daß die fehlende Aktivität nicht ausgeatmet, d.h., daß Testosteron nicht veratmet wird.

Durch Ganzkörperaufarbeitung wurde ermittelt, daß die fehlende Aktivität über längere Zeit im Tierkörper zurückgehalten wird; die Lokalisation der Aktivität im Tierkörper ergab eine Wiederfindung von 20-30% der injizierten Aktivität im Bauch- und Beckenbereich und eine gleichmäßige Verteilung der restlichen Aktivität auf den übrigen Körper.

4.3.2. Differenzierung der ^{14}C -Aktivität im Harn

Zur Differenzierung der über den Harn eliminierten ^{14}C -Aktivität wurden die Harne von vier weiblichen bzw. vier männlichen Meerschweinchen gemeinsam aufgearbeitet.

Im Anschluß an die Extraktion der freien Verbindungen erfolgte in aliquoten Teilen der Harne die Extraktion der durch Glucuronidase- bzw. Sulfatase-spaltung freigesetzten Verbindungen. Die verbliebenen Wasserphasen wurden nach Kellie und Mitarb. (60) extrahiert. Nach Solvolyse der Konjugatextrakte blieben noch 11.8 bzw. 10.9% der Gesamtradioaktivität der Harne als nicht extrahierbare, wasserlösliche Verbindungen in der Wasserphase zurück.

In Tabelle 4 (S.100) ist die prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität auf die vor und nach enzymatischer Hydrolyse sowie auf die nach Solvolyse erhaltenen Extrakte wiedergegeben.

Bei der in der Restwasserphase bleibenden, nicht extrahierbaren Aktivität (Tab.4, Spalte 5) dürfte es sich um nicht spaltbare Steroidkonjugate handeln. Die in Spalte 6 angegebenen Werte stehen für die methodisch bedingten Verluste.

	1	2	3	4	5	6
extra- hierbar	freie Verb.	nach β -Glu- curonidase- spaltung	nach Sulfa- tasespal- tung	nach Solvo- lyse d. Kon- jugatextrakte	Rest- wasser- phase	Ver- luste
männl.	18.1	36.5	5.9	15.3	11.8	12.4
weibl.	16.5	43.5	5.7	12.3	10.9	11.1

Tab.4: Prozentualer Anteil der ^{14}C -Aktivität in den Harnextrakten an der über den Harn ausgeschiedenen Gesamtaktivität vor und nach enzymatischer bzw. chemischer Hydrolyse.

4.3.3. Differenzierung der Konjugate

Nach Extraktion der freien Verbindungen wurden in aliquoten Teilen der Harne die Steroidkonjugate nach Kellie und Mitarb. (60) zur elektrophoretischen Trennung extrahiert. In Tabelle 5 ist die prozentuale Aktivitätsverteilung auf Glucuronide und Sulfate für beide Geschlechter angegeben.

	Glucuronide	Sulfate
männl.	68.9	31.1
weibl.	79.6	20.4

Tab.5: Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität nach elektrophoretischer Trennung der Konjugatextrakte aus dem Harn männlicher und weiblicher Meerschweinchen.

Die Abbildungen 49a-b (S.102) zeigen die Aktivitätsverteilung auf Glucuronide und Sulfate nach elektro-phoretischer Trennung der Konjugatextrakte aus den Harnen männlicher und weiblicher Meerschweinchen.

4.3.4. Charakterisierung des Metabolitenspektrums

Zur Charakterisierung des Metabolitenspektrums wurden die freien Verbindungen und die durch enzymatische und chemische Hydrolyse freigesetzten Verbindungen (S.100, Tab.4, Spalte 1-4) aus den Harnen der männlichen und weiblichen Tiere vereinigt. Den vereinigten Extrakten wurden vor der chromatographischen Trennung je 100 µg folgender Verbindungen zugesetzt: Testosteron, 7α-OH-Androstendion, 6β-OH-Testosteron, 4-Androstendion, Ätiocholanolon und 5β-Dihydrotestosteron. Die vereinigten Extrakte wurden absteigend in PC System I chromatographiert. Nach Abbildung 50 (S.103) blieb der überwiegende Teil der Aktivität am Start liegen (Zone A) während sich ein geringer Anteil (Zone B) mit $R_f=0.32$ abtrennte.

Nach dieser 1.Chromatographie läßt sich bereits vermuten, daß kein Testosteron ausgeschieden wurde und der überwiegende Teil der ausgeschiedenen Aktivität aus stark polaren Verbindungen besteht.

Die Abbildung 51 (S.104) gibt eine Übersicht über die weitere Auftrennung der polaren Zone A. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse erhärten die oben geäußerte Vermutung bezüglich der Zusammensetzung der Zone A. Im wesentlichen besteht diese Zone aus Verbindungen, die sich wie 6β-OH-Testosteron und 7α-OH-Androstendion verhalten. Außerdem wurden zwei Substanzen oder Substanzgemische isoliert, deren Identifizierung nicht möglich war.

Die Abbildung 52 (S.105) gibt schematisch die Identifizierung der unpolaren Zone B wieder. Bei der Chromatographie in mehreren Dünnschichtsystemen mit unterschiedlicher Polarität (DC Syst.I, II, V und VI)

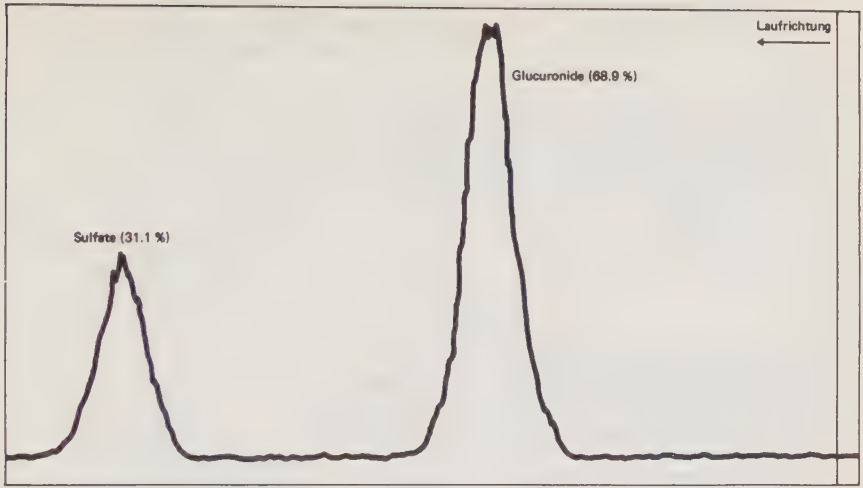


Abb.49a: Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Konjugat-extrakt aus dem Harn männlicher Meerschwein-chen nach elektrophoretischer Trennung (n=4).

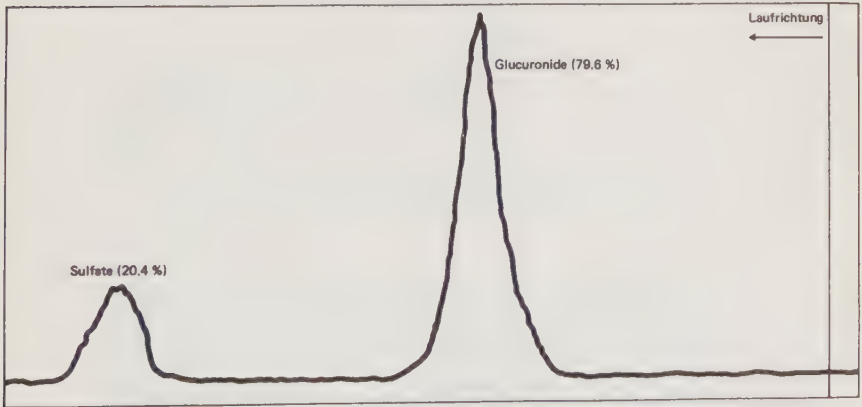


Abb.49b: Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Konjugat-extrakt aus dem Harn weiblicher Meerschwein-chen nach elektrophoretischer Trennung (n=4).

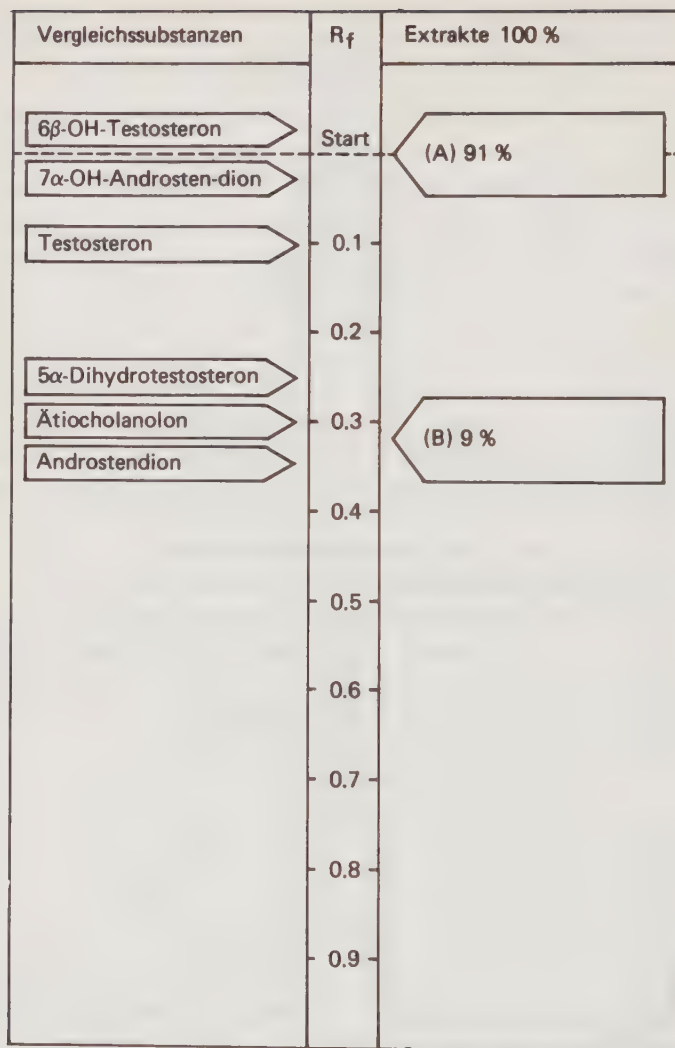


Abb.50: Chromatographie der vor und nach enzymatischer bzw. chemischer Hydrolyse extrahierten Verbindungen aus den Harnen männlicher und weiblicher Meerschweinchen in PC Syst.I.

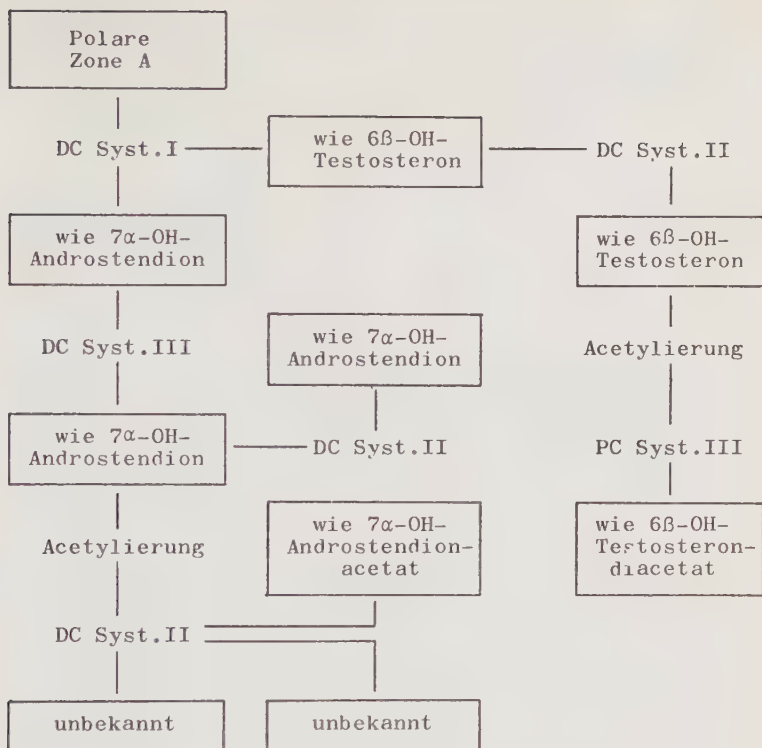


Abb.51: Schematische Darstellung der chromatographischen Differenzierung der polaren Zone A.

blieb die Fraktion einheitlich. Die Vermutung, daß in der Zone B nur eine Substanz vorliegt, wurde bestätigt, als die Fraktion nach erfolgter Acetylierung bzw. Oxydation in den Systemen DC System V und VI re-chromatographiert wurde; der acetylierte Teil verhielt sich in beiden Systemen wie Ätiocholanolon-acetat und der oxydierte Teil verhielt sich in beiden Systemen wie 5β-Androstan-3.17-dion, das Oxydationsprodukt des Ätiocholanolons. Da sich die Zone B bereits in den vorhergehenden Systemen wie Ätiocholan-

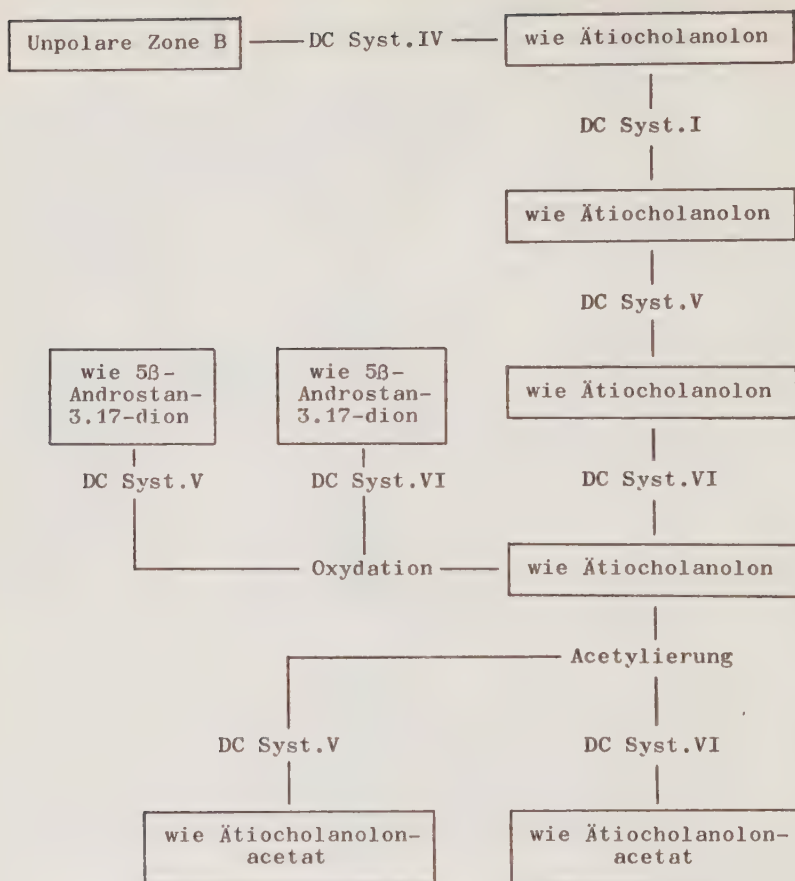


Abb.52: Schematische Darstellung der chromatographischen Identifizierung der unpolaren Zone B.

olon verhielt, ist anzunehmen, daß in ihr Ätiocholanolon vorliegt.

5. Diskussion

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Übertragbarkeit der am Tier erhaltenen Befunde zur erwünschten und unerwünschten Wirkung von Pharmaka auf den Menschen ein großes Problem darstellt. Wenn sich herausstellt, daß bei der ersten Untersuchung eines Pharmakons beim Menschen die beim Tier beobachtete Wirkung nicht auftritt, ist dies an sich unproblematisch. Sehr problematisch ist es dagegen, wenn bei der Anwendung eines neuen Pharmakons beim Menschen Wirkungen auftreten, die bei der tierexperimentellen Untersuchung nicht entdeckt wurden (Falsch-negative Ergebnisse der toxikologischen Prüfung!). Nicht selten tritt aber auch der Fall auf, daß bei der toxikologischen Prüfung Wirkungen beobachtet werden, die bei der klinischen Anwendung nicht auftreten (Falsch-positive Ergebnisse der toxikologischen Prüfung!).

In der Einleitung wurde auch bereits darauf hingewiesen, daß an sich in der Pharmakologie und der Toxikologie nur solche Spezies verwendet werden dürften, die sich sowohl im Hinblick auf die erwünschte Wirkung als auch im Hinblick auf die unerwünschte Wirkung des untersuchten Pharmakons genau wie der Mensch verhalten. Diese Forderung ist nicht realisierbar. Selbst wenn sich eine bestimmte Spezies im Hinblick auf erwünschte und unerwünschte Wirkungen des verabreichten Pharmakons (unveränderte Verbindung) genau wie der Mensch verhält, bliebe der große Unterschied, der aus den starken Speziesunterschieden bezüglich Kinetik und Stoffwechsel des Pharmakons resultiert.

Da die meisten Pharmaka organische Verbindungen sind, entsteht aus diesen speziesabhängig eine mehr oder weniger große Zahl von Metaboliten. Wenn die Überführung des Pharmakons in Metabolite einer Inaktivierung bezüglich der erwünschten und unerwünschten Wirkung entspricht und wenn diese Metabolite im Körper nicht kumulieren, dann ist die Metabolisierung im Sinne ei-

ner Entgiftung als erwünschter Vorgang zu betrachten. Häufig entstehen bei der Metabolisierung eines Pharmakons biologisch noch wirksame Substanzen, die dann zum Wirkungsbild in erwünschtem oder unerwünschtem Sinne beitragen können. Die Bemühungen in der Pharmakologie und der Toxikologie sind darauf gerichtet, Tierspezies zu finden, die bezüglich erwünschter und unerwünschter Wirkungen von Pharmaka eine relevante Aussage im Hinblick auf die Anwendung beim Menschen zulassen. Die vorliegende Arbeit ist unter diesem Gesichtspunkt zu verstehen.

Bei den hier dargestellten Untersuchungen wurde für die vergleichenden Stoffwechseluntersuchungen zum Metabolismus bei verschiedenen Spezies vorwiegend das männliche Sexualhormon Testosteron benutzt. Dabei sollte der Testosteronstoffwechsel bei verschiedenen Spezies nicht detailliert untersucht werden, d.h. die bei den einzelnen Spezies auftretenden Metabolite sollten nicht vollständig identifiziert und analysiert werden; es ging vielmehr darum, ob mit rasch durchführbaren in vitro-Methoden Speziesunterschiede im Testosteronabbau erfaßt werden können. Als Spezies wurden die im Labor häufig benutzten Tiere Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen gewählt.

Bei der Betrachtung der untersuchten Tiere unter zoologisch-systematischem Aspekt muß festgestellt werden, daß die Tiere der artenreichen Gruppe der Nager (Rodentia) entnommen sind. Die Gruppe der Nager umfaßt zwei Ordnungen, deren erste die Hasen (Leporidae) und damit die Kaninchen (*Oryctolagus*) beschreibt; die zweite Ordnung umfaßt unter anderem die Familie der Mäuseartigen (Muridae), zu der man die Hamster (*Cricetus*), die Ratten (*Epymis*) und die Mäuse (*Mus*) zählt; als weitere Familie der zweiten Ordnung betrachtet man die Familie der Meerschweinchenartigen (Caviidae), die durch eine einzige Gattung, das Meerschweinchen, repräsentiert wird.

Damit sind die untersuchten Tiere grob in die zoologische Systematik eingeordnet, wobei stets zu berücksichtigen ist, daß die hier genannten Tiere nur als Beispiele für die untersuchten Spezies dienen.

sichtigen ist, daß sich diese Systematik ausschließlich nach anatomischen bzw. morphologischen Gesichtspunkten aufbaut.

Nach stammes- bzw. entwicklungsgeschichtlichen Maßstäben stellen die Nager unter den Säugern eine recht alte Gruppe dar, was sich unter anderem aus der relativ einfachen Struktur ihres Gehirns ableitet.

Bemerkenswert ist, daß der haploide Chromosomensatz des wohl stammesgeschichtlich primitivsten Tieres dieser Gruppe, des Kaninchens, nur 12 Chromosomen enthält, wogegen der haploide Satz der Ratte und der Maus aus 19 und der des Meerschweinchens aus 28 Chromosomen besteht. Aus dieser Tatsache läßt sich ableiten, daß der Versuch, aus der historischen Entwicklung des Erbmaterials auf eine parallele Entwicklung der Tiere und eine eventuelle Verwandtschaft in physiologischer oder biochemischer Hinsicht zu schließen, zu Fehldeutungen führen kann.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen bezüglich der biochemischen Verwandtschaft der in dieser Arbeit verwendeten Tiere beziehen sich lediglich auf die Aufklärung von Aminosäuresequenzen einiger ausgewählter Proteine, wie zum Beispiel des Hämoglobins oder des Insulins. Aus diesem Grunde kann an dieser Stelle leider keine Aussage über die Entwicklung der Enzymausstattung der Leber gemacht werden.

Bei den unter 4.1. (S.31) beschriebenen vergleichenden Untersuchungen zur Ring-A-Reduktion des Testosterons wurde der 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher Ratten, Mäuse, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen benutzt. Die Inkubationen wurden im NADPH-regenerierenden System, bestehend aus Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und NADP^+ , durchgeführt. Da der 10 000Xg-Überstand neben Cytosol im wesentlichen Mikrosomen enthält, sollte unter den angewendeten Bedingungen die im Cytosol und in den Mikrosomen lokalisierte Ring-A

reduzierende Enzymaktivität erfaßt werden.

Der im 10 000Xg-Überstand und dem NADPH-regenerierenden System untersuchte Testosteronschwund wurde jeweils über 25 Minuten gemessen, indem nach chromatographischer Differenzierung das unveränderte Testosteron neben seinen Metaboliten bestimmt wurde. Da aber nicht bekannt ist, in welchem Maße und wie schnell die Komponenten des NADPH-regenerierenden Systems (G-6-P, G-6-P-DH und NADP^+) in den 10 000Xg-Überständen der Leberhomogenate der verschiedenen Spezies inaktiviert werden, ist der nach 25 Minuten gemessene Testosteronschwund zur Aussage über die Ring-A-Reduktion bzw. die reduzierende Enzymaktivität nicht verwertbar.

Die in Abbildung 26 (S.63) wiedergegebenen Untersuchungen sprechen dafür, daß das NADPH-regenerierende System während der Inkubation inaktiviert wird. Bei Inkubationen mit dem 10 000Xg-Überstand aus dem Leberhomogenat der männlichen Maus zeigt die Zeit-Umsatz-Kurve bereits nach 15 Minuten, daß das NADPH-regenerierende System nicht mehr intakt ist; dagegen hat die Zeit-Umsatz-Kurve, die aus Inkubationen mit dem 10 000Xg-Überstand aus dem Leberhomogenat männlicher Ratten ermittelt wurde, nach initial steilerem bzw. schnellerem Verlauf des Testosteronabbaus einen fast linearen Anstieg bis 25 Minuten. Daraus ergibt sich, daß nur aus der graphischen Extrapolation der Initialgeschwindigkeit des Testosteronabbaus eine angenäherte Aussage über die Testosteron abbauende Enzymaktivität im 10 000Xg-Überstand der untersuchten Spezies möglich ist.

Aus Tabelle 1 (S.64) folgt, daß unter den angewendeten Bedingungen die Maus und der Hamster als Spezies mit besonders ausgeprägter Stoffwechselaktivität der Ratte und dem Kaninchen als Spezies mit geringerem Testosteronumsatz gegenübergestellt werden können. Eine Sonderstellung nimmt das Meerschweinchen ein, da unter den angewendeten, stets genormten Versuchsbedingungen praktisch kein Testosteronabbau zu messen war. Da das Meerschweinchen bezüg-

lich des Körpergewichts zwischen Ratte und Kaninchen eingeordnet werden kann, spricht der fehlende Testosteronabbau im 10 000Xg-Überstand aus dem Homogenat der Meerschweinchenleber dafür, daß dieses Ergebnis auf eine qualitativ von den anderen Spezies verschiedene Ausstattung der Meerschweinchenleber mit Testosteron reduzierenden Enzymen zurückzuführen ist. Bei dem Vergleich der Abbildungen 3, 6 und 9 (S.33,37 und 40) ist festzustellen, daß unter den verwendeten Versuchsbedingungen aus Testosteron durch Inkubation mit dem 10 000Xg-Überstand der Leber von Ratten, Mäusen und Hamstern ein qualitativ gleiches Metabolitenpektrum entsteht. Es ist allerdings bemerkenswert, daß bei der Ratte und der Maus während der Inkubation (2-25 Min.) der Anteil der reduzierten (stärker polaren) Metabolite gegenüber dem Oxydationsprodukt (4-Androstendion) deutlich überwiegt; so entfallen nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Ratte und Maus ca. 70% der entstehenden Testosteronmetabolite auf im Ring A reduzierte Verbindungen und ca. 30% auf das 4-Androstendion. Im Gegensatz dazu ist beim Hamster unter den gleichen Versuchsbedingungen der Anteil der reduzierten Testosteronmetabolite mit ca. 50% deutlich geringer; beim Hamster entfallen nach einer Inkubation von 5 Minuten ca. 50% der entstandenen Metabolite auf das 4-Androstendion.

Überraschend war der Befund, daß bei der Inkubation von Testosteron mit dem 10 000Xg-Überstand der Leber männlicher und weiblicher Kaninchen das 4-Androstendion nur in so geringen Spuren auftrat, daß eine quantitative Bestimmung nicht möglich war. Bei gleichen Versuchsbedingungen unterscheidet sich damit das mit dem 10 000Xg-Überstand aus der Leber des Kaninchens erhaltene Metabolitenmuster qualitativ von dem der Ratte, der Maus und des Hamsters.

Bei männlichen und weiblichen Kaninchen traten unter den verwendeten in vitro-Bedingungen praktisch nur im

Ring A reduzierte Verbindungen auf, die sich nach chromatographischer Differenzierung wie 3,17-Diole verhielten. Dieser Befund ist besonders überraschend, da die Kaninchenleber nach den weiter unten diskutierten Befunden in hohem Maße in der Lage ist, die 17 β -OH-Gruppe des Testosterons in Gegenwart von NAD⁺ bzw. NADP⁺ zu oxydieren. Die Ursache für das Fehlen des 4-Androstendions bei Inkubation von Testosteron mit dem 10 000Xg-Überstand der Kaninchenleber im Gegensatz zu den bei Ratte, Maus und Hamster erhaltenen Befunden sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

Zur Oxydation der 17 β -OH-Gruppe des Testosterons ist NAD⁺ bzw. NADP⁺ als Wasserstoffakzeptor erforderlich; setzt man dies voraus, so ist eine mögliche Erklärung für die oben genannten Ergebnisse die Vermutung, daß in der Kaninchenleber das bei der Ring-A-Reduktion mit NADPH entstehende NADP⁺ sofort durch das NADPH-regenerierende System wieder zum NADPH reduziert wird, sodaß eine NADP⁺-Konzentration praktisch nicht vorhanden ist. Im Gegensatz dazu könnte bei der Ratte, der Maus und dem Hamster durch starke Transhydrogenaseaktivität der Wasserstoff des NADPH in so ausreichendem Maße auf andere Wasserstoffakzeptoren übertragen werden, daß eine zur Oxydation der 17 β -OH-Gruppe im Testosteron führende NADP⁺-Konzentration entsteht.

Im Gegensatz zu den an Ratte, Maus, Hamster und Kaninchen erhaltenen Befunden war der Testosteronumsatz durch den 10 000Xg-Überstand der Leber von Meerschweinchen praktisch überhaupt nicht nachweisbar. Ein unter den angewendeten Bedingungen in Spuren auftretender Metabolit verhielt sich wie 4-Androstendion. Aus diesen Befunden folgt, daß unter den hier verwendeten in vitro-Bedingungen die Leber des Meerschweinchens nicht in der Lage ist, Testosteron im Ring A zu reduzieren. Dies entspricht den in der Einleitung bereits erwähnten Ergebnissen (30,31), nach denen die Meerschweinchenleber nur in äußerst geringem Umfang Reduktionsprodukte des

Testosterons bildet und vermehrt zur Bildung von Oxydations- bzw. Hydroxylierungsprodukten neigt.

Da beim männlichen und weiblichen Kaninchen im Gegensatz zu den bei den anderen untersuchten Spezies erhaltenen Befunden im 10 000Xg-Überstand der Leber praktisch kein 4-Androsten entstand (Abb.12 und 16, S.45 und 50), wurde in einem orientierenden Versuch unter Benutzung verschiedener Zellfraktionen der Kaninchenleber geprüft, ob sich dieser Befund reproduzieren ließ (Abb.13 und 17, S.46 und 52). Dabei zeigte sich, daß eine den Ring A reduzierende Enzymaktivität sowohl im partikelfreien Cytoplasma als auch in der Mikrosomenfraktion der männlichen und weiblichen Kaninchenleber lokalisiert ist. Nur bei der Inkubation von Testosteron mit der Mikrosomenfraktion trat bei beiden Geschlechtern in sehr geringer Menge eine unpolare, radioaktive Verbindung auf, die sich chromatographisch wie 4-Androstendion verhielt. Die Verteilung der den Ring A reduzierenden Enzymaktivität auf Überstand und Mikrosomenfraktion der Kaninchenleber entspricht den Befunden bei anderen Säugerspezies, wie in der Einleitung bereits erwähnt.

Da die oben diskutierten Befunde darauf hinweisen, daß sowohl die männliche als auch die weibliche Kaninchenleber unter den angewendeten Bedingungen nur in sehr geringem Umfang Testosteron zu 4-Androstendion metabolisiert, ergab sich die Frage, ob die fast ausschließliche Bildung von Reduktionsprodukten nur für das C₁₉-Steroid Testosteron gilt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß das Kaninchen in der Pharmakologie als Modell für Gestagentests besondere Bedeutung hat, wurde das Progesteron als C₂₁-Steroid gewählt, das wie Testosteron im Ring A eine Δ^4 -3-Keto-Gruppierung besitzt. Die Inkubationen wurden wie beim Testosteron im NADPH-regenerierenden System mit dem 10 000Xg-Überstand sowohl der männlichen als auch der weiblichen Kaninchenleber durchgeführt. Wie bei den Untersuchungen zum Testosteronstoff-

wechsel wurde der Progesteronschwund nach chromatographischer Abtrennung der entstandenen Metabolite bestimmt. Nach den in den Abbildungen 19 und 23 (S.55 und 59) gezeigten Scannerdiagrammen lassen sich nach der Inkubation von Progesteron mit dem 10 000Xg-Überstand sowohl der männlichen als auch der weiblichen Kaninchenleber im wesentlichen zwei Peaks radioaktiver Metabolite des Progesterons chromatographisch nachweisen. Die chromatographische Differenzierung dieser stärker polaren Metabolite (Zone a und b in Abb.19 und 23) zeigte, daß sich die in der Zone a enthaltenen vier radioaktiven Substanzen chromatographisch wie die Isomeren des im Ring A und an C₂₀ durchhydrierten Progesterons (Pregnan-3,20-diole) verhielten. Nach Rechromatographie der Zone b verhielt sich der darin enthaltene Metabolit wie an C₂₀ reduziertes Progesteron. Die nur in Spuren auftretende Zone c in den Abbildungen 19 und 23 konnte nicht näher charakterisiert werden. Die bei der Rechromatographie des Progesteron-Peaks (Zone d) auftretende, vergleichsweise stärker polare Zone d₁ verhielt sich wie nur im Ring A reduziertes Progesteron. Da der Metabolit d₁ acetylierbar war, darf man annehmen, daß es sich bei dieser Verbindung um ein Pregnan-3-ol-20-on handelt.

Die Untersuchungen mit dem 10 000Xg-Überstand zeigten, daß Progesteron durch Lebergewebe männlicher und weiblicher Kaninchen offensichtlich mit wesentlich höherer Geschwindigkeit metabolisiert wird als Testosteron (Tabelle 2, S.66). Es ist bemerkenswert, daß der Progesteronabbau im 10 000Xg-Überstand aus der Leber männlicher Kaninchen (ca.95% in 5 Min.) deutlich rascher verläuft als bei weiblichen Kaninchen (ca.66% in 5 Min.).

Die vergleichenden Untersuchungen mit Testosteron und Progesteron zeigen, daß sich durch die verwendete in vitro-Methodik deutliche Unterschiede in enzymatischen Reaktionen des Stoffwechsels aufdecken lassen, die sowohl durch das verwendete Steroid als auch durch die

verwendete Spezies und das Geschlecht bedingt sein können.

Neben der Ring-A-Reduktion ist die Oxydation der 17β -OH-Gruppe ein wesentlicher Schritt im Stoffwechsel des Testosterons. Da die Oxydation der 17β -OH-Gruppe in vivo einer biologischen Inaktivierung des Testosterons entspricht, ist eine Aussage über diese Reaktion im Hinblick auf mögliche Voraussagen zur in vivo-Wirkung von Testosteron aus in vitro-Untersuchungen besonders wichtig. Es sollte hier darauf hingewiesen werden, daß in vivo sowohl die zur Inaktivierung des Testosterons führende Oxydation der 17β -OH-Gruppe abläuft als auch die Reduktion der 17-Keto-Gruppe zur 17β -OH-Gruppe. Die zur Inaktivierung führende Oxydationsreaktion ist allerdings deutlich bevorzugt.

Entsprechend den Angaben von Endahl, Kochakian und Hamm (34) wurden für die Untersuchung der 17-Oxydation des Testosterons das Vollhomogenat, der 24 500Xg-Überstand und das 24 500Xg-Sediment der Leber benutzt. Die Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit an der Ratte, der Maus, dem Hamster, dem Meerschweinchen und dem Kaninchen durchgeführt, wobei als Wasserstoffakzeptoren die Cofaktoren NAD^+ und $NADP^+$ eingesetzt wurden. Bei allen Untersuchungen war neben unverändertem Testosteron als Metabolit nur das 4-Androstendion nachweisbar. Die Bestimmung des Testosteronschwundes und der gleichzeitigen Zunahme von 4-Androstendion erfolgte nach chromatographischer Auftrennung der Extrakte. In den Abbildungen 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41 sowie 44 und 45 (S.68-92) ist der auf jeweils 1 mg Protein bezogene Testosteronschwund für die Untersuchungen mit Vollhomogenat, sowie dem 24 500Xg-Überstand und -Sediment angegeben. Um annähernd die Aktivität der an der Oxydation der 17β -OH-Gruppe beteiligten Enzyme vergleichen zu können, wurde aus den Zeit-Umsatz-Kurven die Initialgeschwindigkeit auf 5

Minuten extrapoliert und so für alle untersuchten Tiere der Testosteronschwund pro mg Leberprotein bestimmt. Die so erhaltenen, nur als Näherungswerte zu betrachtenden Ergebnisse sind in Tabelle 3 (S.97) zusammengefaßt.

Aus der Tabelle 3 geht hervor, daß die 17-Oxydation des Testosterons in der Leber der Ratte NAD^+ -abhängig ist und mit NADP^+ als Cofaktor nur in sehr geringem, praktisch zu vernachlässigendem Ausmaß abläuft. Bei allen anderen Spezies ist die 17-Oxydation sowohl NAD^+ - als auch NADP^+ -abhängig.

Die Tabelle 3 zeigt deutliche Speziesunterschiede hinsichtlich der Verteilung der 17 β -OH-Dehydrogenase auf 24 500Xg-Überstand und -Sediment. Bei der Ratte ist die NAD^+ -abhängige 17 β -OH-Dehydrogenase vorwiegend im Sediment (Mikrosomen) lokalisiert; bei der Maus dagegen ist die NADP^+ - und NAD^+ -abhängige 17 β -OH-Dehydrogenase sehr weitgehend im 24 500Xg-Überstand (Cytosol) enthalten. Beim Hamster ist die Enzymaktivität wie bei der Maus bevorzugt im Überstand vorhanden, beim Meerschweinchen dagegen wie bei der Ratte bevorzugt im Sediment.

Bei Betrachtung der Geschwindigkeit der 17-Oxydation, unabhängig von der Cofaktorenabhängigkeit und auch unabhängig von der Lokalisation der Enzymaktivität im Überstand und Sediment, kann man die Ratte und den Hamster als Spezies mit relativ niedriger Oxydationsgeschwindigkeit dem Meerschweinchen, der Maus und dem Kaninchen mit hoher Oxydationsgeschwindigkeit gegenüberstellen.

Bei Vergleich der in Tabelle 1 (S.64) zusammengefaßten Daten zur Ring-A-Reduktion des Testosterons bei verschiedenen Spezies mit den in Tabelle 3 (S.97) zusammengestellten Daten zur 17-Oxydation, wird deutlich, daß die Meerschweinchenleber unter den angewendeten Bedingungen nicht zur Ring-A-Reduktion, wohl aber ausgeprägt zur 17-Oxydation befähigt ist. Da aus Literaturbefunden (30, 31) bekannt ist, daß Testosteron durch die Meerschweinchenleber in hohem Maße in Hydroxylier-

rungsprodukte überführt wird, kann unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde das Meerschweinchen zumindest im Hinblick auf den Testosteronstoffwechsel als eine Spezies mit einem ausgeprägten oxydativen Stoffwechsel klassifiziert werden. Der Vergleich der Tabellen 1 und 3 zeigt, daß dem gegenüber beim Hamster offensichtlich die Ring-A-Reduktion gegenüber der 17-Oxydation stark bevorzugt ist, so daß der Hamster im Gegensatz zum Meerschweinchen als Spezies mit einem vorwiegend reduktiven Testosteronstoffwechsel klassifiziert werden kann. Die Ratte nimmt eine Sonderstellung ein, da beim Testosteron sowohl die Ring-A-Reduktion als auch die 17-Oxydation relativ langsam verläuft. Es ist bemerkenswert, daß trotz der entwicklungsgeschichtlichen Verwandtschaft von Ratte und Maus ausgeprägte Unterschiede im Testosteronstoffwechsel unter den angewendeten Versuchsbedingungen deutlich werden. Im Gegensatz zur Ratte wird Testosteron durch Lebergewebe der Maus *in vitro* sowohl im Ring A reduktiv als auch an C₁₇ oxydativ mit hoher Geschwindigkeit metabolisiert.

Bisher liegen keine vergleichenden *in vivo*-Untersuchungen zur Empfindlichkeit der hier untersuchten Spezies gegenüber dem Testosteron vor. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob die deutlichen Speziesunterschiede hinsichtlich des Testosteronstoffwechsels in der Leber *in vitro* mit der androgenen Wirkung von Testosteron bei diesen Spezies korreliert werden können. Man könnte erwarten, daß die Spezies mit einem geringen Testosteronabbau *in vitro* unter *in vivo*-Bedingungen empfindlicher auf Testosterongaben reagieren, da man bei ihnen unter *in vivo*-Bedingungen eine längere Halbwertszeit für Testosteron erwarten könnte und damit eine stärkere und/oder längere Wirkung in den testosteronabhängigen Zielorganen.

Bei den *in vitro*-Versuchen unterschied sich das Meerschweinchen von den übrigen Spezies dadurch, daß Testosteron unter den angewendeten Versuchsbedingungen durch

Lebergewebe nicht im Ring A reduziert wurde. Im Hinblick auf die Frage nach der Übertragbarkeit der in vitro-Befunde auf in vivo-Bedingungen wurde in orientierenden Versuchen 4-¹⁴C-Testosteron Meerschweinchen intraperitoneal verabreicht und die Ausscheidung der Radioaktivität über Harn und Stuhl untersucht. Unter in vivo-Bedingungen wird Testosteron beim Menschen vorwiegend nach Ring-A-Reduktion und 17-Oxydation, sowie nach Bildung wasserlöslicher Konjugate über Harn und Stuhl eliminiert. Die Analyse der mit dem Harn ausgeschiedenen radioaktiven Verbindungen zeigte, daß 16-18% der insgesamt im Harn nachweisbaren Aktivität auf nicht konjugierte Verbindungen entfielen. Im Vergleich zu den vom Menschen bekannten Untersuchungsergebnissen ist dies ein sehr hoher Anteil. Nach Applikation von 4-¹⁴C-Testosteron beim Menschen erscheint im Harn nur ca.1% der Radioaktivität als unkongjugierte Verbindungen.

Die elektrophoretische Untersuchung der radioaktiven Verbindungen im Meerschweinchenharn zeigte, daß ca. 40% der Gesamtradioaktivität im Harn auf Glucuronide und ca.6% auf enzymatisch spaltbare Schwefelsäureester sowie ca.15% auf solvolysierbare Konjugate entfallen (Tab.4, S.100).

Die chromatographische Differenzierung der insgesamt aus dem Harn nach enzymatischer und chemischer Hydrolyse extrahierbaren radioaktiven Verbindungen ergibt, daß der weitaus größte Teil auf hochpolare Metabolite entfällt, die sich im wesentlichen wie 7 α -OH-4-Androst-3,17-dion und 6 β -OH-Testosteron verhielten. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß entsprechend den in vitro-Befunden auch in vivo bei der Metabolisierung des Testosterons die Ring-A-Reduktion nur eine untergeordnete Rolle spielt und daß statt dessen die 17-Oxydation und die Hydroxylierung des Testosterons als Inaktivierungsschritte im Vordergrund stehen. Aus Untersuchungen zum Steroidstoffwechsel ist bekannt, daß

bei gehemmter Ring-A-Reduktion der Organismus zur Inaktivierung des Steroids auf Hydroxylierungsreaktionen ausweicht. Das bekannteste Beispiel sind die synthetischen Corticoide mit einer Δ^1, Δ^4 -3-Keto-Gruppierung im Ring A. Bei Corticoiden mit dieser Anordnung ist die enzymatische Reduktion des Ringes A sehr weitgehend gehemmt. In diesem Falle überwiegen 6-OH-Verbindungen (61).

Neben den vorwiegend vorhandenen hydroxylierten Testosteronmetaboliten war in geringer Menge ein radioaktiver Metabolit im Harn des Meerschweinchens nachweisbar, der sich chromatographisch wie 5 β -Androsteron (Ätiocholanolon) verhielt. Die vorliegenden Untersuchungen erlauben keine Aussage über den Entstehungsort dieses im Ring A reduzierten Metaboliten. Es ist nicht auszuschließen, daß diese Verbindung in extrahepatischen Geweben gebildet wird, wie z.B. der Haut und/oder endokrinen Organen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die orientierenden in vivo-Untersuchungen am Meerschweinchen mit Testosteron nicht im Widerspruch zu den in vitro-Untersuchungen mit dem Lebergewebe dieser Spezies stehen. Weitere vergleichende Untersuchungen in vivo und in vitro mit Testosteron und anderen Steroiden (Progesteron, Östradiol und Hydrocortison) bei verschiedenen Spezies müssen zeigen, welche Relevanz die mit Lebergewebe in vitro erhaltenen Befunde zum Testosteronstoffwechsel im Hinblick auf den Steroidstoffwechsel besitzen.

6. Literatur

- (1) Dorfman, R.I. und F. Ungar:
Metabolism of Steroid Hormones,
Academic Press, New York und London (1965)
- (2) Ungar, F., M. Gut und R.I. Dorfman:
J. biol. Chem., 224, 191 (1957)
- (3) McGuire, J. und G.M. Tomkins:
Fed. Proc., 19, 29 (1960)
- (4) Forchielli, E. und R.I. Dorfman:
J. biol. Chem., 223, 443 (1956)
- (5) Tomkins, G.M.:
J. biol. Chem., 225, 13 (1957)
- (6) Yates, F.E., A.L. Herbst und J. Urquhart:
Endocrinology, 63, 887 (1958)
- (7) Leybold, K. und H.J. Staudinger:
B.Z., 331, 389 (1959)
- (8) Forchielli, E., K. Brown-Grant und R.I. Dorfman:
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 99, 594 (1958)
- (9) Leybold, K. und H.J. Staudinger:
Med. exp., Basel, 2, 46 (1960)
- (10) Breuer, H.: Steroid-Dehydrogenasen
in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der
physiol.- und pathol.-chem. Analyse,
10. Aufl., Bd. VI/A, S. 423,
Springer-Verlag, Heidelberg (1964)
- (11) Ota, M., N. Sato und K. Obara:
J. Biochem., 72, 11 (1972)

- (12) Gustafsson, J.-A. und B.P.Lisboa:
Eur. J. Biochem., 12, 369 (1970)
- (13) Bonne, C. und J.-P.Raynaud:
Biochimie, 55, 227 (1973)
- (14) Nozu, K. und B.Tamaoki:
Acta Endocrinol., 73, 585 (1973)
- (15) Nozu, K. und B.Tamaoki:
Acta Endocrinol., 76, 608 (1974)
- (16) Björkhem, I., H.Danielsson und K.Wikvall:
Eur. J. Biochem., 36, 8 (1973)
- (17) McGuire, J.S.jr. und G.M.Tomkins:
J. biol. Chem., 234, 791 (1959)
- (18) McGuire, J.S.jr., V.C.Hollis und G.M.Tomkins:
J. biol. Chem., 235, 3112 (1960)
- (19) Ringold, H.J., S.Ramachandran und E.Forchielli:
J. biol. Chem., 237, 260 (1962)
- (20) Langecker, H.:
Arzneim.-Forsch., 12, 61 (1962)
- (21) Krüskemper, H.L. und H.Breuer:
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.,
67.Kongr., S.387 (1961)
- (22) Krüskemper, H.L. und H.Breuer:
Intern. Congr. on Hormonal Steroids,
Milano, S.209 (1962)
- (23) Breuer, H., H.L.Krüskemper und W.Bartsch:
Dtsch. Med. Wschr., 87, 1349 (1962)

- (24) Gerhards, E., G. Raspé und R. Wiechert:
Arzneim.-Forsch., 17, 431 (1967)
- (25) Gerhards, E., H. Gibian und K. H. Kolb:
Arzneim.-Forsch., 16, 458 (1966)
- (26) Levedahl, B. H. und L. T. Samuels:
J. biol. Chem., 186, 857 (1950)
- (27) Kochakian, C. D., B. R. Carroll und B. Uhri:
J. biol. Chem., 224, 811 (1957)
- (28) Kochakian, C. D., V. Raut und D. M. Nall:
Amer. J. Physiol., 189, 78 (1957)
- (29) Kochakian, C. D. und G. Stidworthy:
J. biol. Chem., 210, 933 (1954)
- (30) Demisch, K., P. Birkelbach und W. Staib:
Z. Physiol. Chem., 350, 1172 (1969)
- (31) Demisch, K. und W. Staib:
Eur. J. Biochem., 7, 324 (1969)
- (32) Reuber, R. und J. Schmidt-Thomé: Steroidhormone
in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der
physiol.- und pathol.-chem. Analyse,
10. Aufl., Bd. III/2. Bandteil, S. 1540,
Springer-Verlag, Heidelberg, 1964
- (33) Brown-Grant, K., E. Forchielli und R. I. Dorfman:
J. biol. Chem., 235, 1317 (1960)
- (34) Endahl, G. L., C. D. Kochakian und D. Hamm:
J. biol. Chem., 235, 2792 (1960)
- (35) Hagermann, D. D. und C. A. Villee:
J. biol. Chem., 234, 2031 (1959)

- (36) Breuer, H. und P. Ball:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 1011 (1970)
- (37) Jarabak, J., J. A. Adams,
H. G. Williams-Ashman und P. Talalay:
J. biol. Chem., 237, 345 (1962)
- (38) Kochakian, C. D., J. Gongora und M. Parente:
J. biol. Chem., 196, 243 (1952)
- (39) Bongiovanni, A. M. und J. Marino:
J. Steroid Biochem., 3, 859 (1972)
- (40) Bhavani, B. R., K. N. Shah und S. Solomon:
Biochem., 11, 753 (1972)
- (41) Taylor, W. :
Biochem. J., 60, 380 (1955)
- (42) Chatterton, R. T. jr., A. J. Chatterton und L. Hellman:
Endocrinology, 87, 941 (1970)
- (43) Demisch, K., U. Ammedick und W. Staib:
Eur. J. Biochem., 8, 284 (1969)
- (44) Shire, J. G. M., S. Kessler und R. B. Clayton:
J. Endocrin., 52, 591 (1972)
- (45) Arimasa, N. und C. D. Kochakian:
Endocrinology, 92, 72 (1973)
- (46) Thorsen, T. und K. F. Stoa:
J. Steroid Biochem., 2, 43 (1971)
- (47) Lerner, N., S. Sulimovici und B. Lunenfeld:
J. Steroid Biochem., 4, 193 (1973)

- (48) Rembiesa, R., M. Marchut und A. Warchol:
J. Steroid Biochem., 2, 111 (1971)
- (49) Maynard, P.V. und E.H.D. Cameron:
Biochem. J., 126, 99 (1972)
- (50) Coffey, J.C.:
Steroids, 22, 247 (1973)
- (51) Kasai, H., S. Mizutani und K. Matsumoto:
Acta Endocrinol., 74, 177 (1973)
- (52) Schriefers, H. et al.:
Acta Endocrinol., 40, 140 (1962)
- (53) Schriefers, H. et al.:
Acta Endocrinol., 46, 89 (1964)
- (54) Lowry, O.H.:
J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
- (55) Kochakian, C.D. und G. Stidworthy:
J. Biol. Chem., 199, 607 (1952)
- (56) Kritchevsky und Kirk:
Arch. Biochem. Biophys., 35, 346 (1952)
- (57) Lewbart und Schneider:
Nature, 176, 1175 (1955)
- (58) Arx und Neher:
Unveröffentlicht (1961)
- (59) Menini, E. und J.E. Norymberski:
Biochem. J., 84, 195 (1962)
- (60) Kellie, A.E. und A.P. Wade:
Biochem. J., 66, 196 (1957)

- (61) Gerhards, E., B. Nieuweboer, G. Schulz und H. Gibian:
Acta Endocrinol., 68, 98 (1971)
-

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Gerhards, Mitglied der Pharmaforschungsleitung der Schering AG Berlin/Bergkamen, danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. K. Graszynski, Institut für Tierphysiologie und Angewandte Zoologie der Freien Universität Berlin, für seine Hilfe bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Den Damen und Herren, die mir bei der Laborarbeit mit ihrem Rat behilflich waren, besonders Herrn W. Hecker, bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet.

7. Lebenslauf

Am 29. August 1944 wurde ich als Sohn des Missionars Fritz Richter und seiner Ehefrau Hildgard, geb. Ruhnke in Braunau, Kr. Lüben/Schlesien geboren.

Meine Einschulung erfolgte 1950 an der 31. Grundschule im Bezirk Berlin-Prenzlauer Berg. Im Verlauf eines Umzuges nach Berlin-Lichterfelde wurde ich 1957 an die Lilienthal-Schule umgeschult, an der ich 1966 das Abitur bestand.

Im gleichen Jahr begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Biologiestudium und legte 1969 die Vorprüfung zum Diplom ab.

Nachdem ich bei der Firma Schering AG meine Diplom-Arbeit angefertigt hatte, bestand ich 1975 an der Freien Universität Berlin die Diplom-Prüfung.
